



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110520149 A

(43)申请公布日 2019.11.29

(21)申请号 201780085212.6

(22)申请日 2017.12.01

(30)优先权数据

62/429,516 2016.12.02 US

62/466,937 2017.03.03 US

62/529,866 2017.07.07 US

62/558,790 2017.09.14 US

62/582,829 2017.11.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.31

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/064323 2017.12.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/102760 EN 2018.06.07

(71)申请人 比奥维拉迪维治疗股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

申请人 瑞典孤儿比奥维特鲁姆有限公司

(72)发明人 J·杜蒙 N·贾恩 S·莱瑟根

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 史悦

(51)Int.Cl.

A61K 38/37(2006.01)

A61K 38/48(2006.01)

A61P 7/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书57页 附图16页

(54)发明名称

诱导对凝血因子的免疫耐受性的方法

(57)摘要

本公开提供诱导人类的免疫耐受性的方法，其包括向所述人类施用有效量的包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白。

1. 包含凝血因子和Fc区的嵌合蛋白在用于诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法中的用途,其中

(1) 向所述人类施用有效量的包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白持续足以诱导免疫耐受性的时间,其中所述有效量的包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白诱导所述人类的免疫耐受性;并且

(2) 在诱导免疫耐受性之后,向所述人类施用包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白的减量方案。

2. 如权利要求1所述的用途,其中包含FVIII和Fc区的所述嵌合蛋白的所述有效量为约50 IU/kg至约300 IU/kg。

3. 包含凝血因子和Fc区的嵌合蛋白在用于诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法中的用途,其中向所述人类施用约200 IU/kg的所述嵌合蛋白持续足以诱导免疫耐受性的时间,并且其中所述人类已产生针对所述凝血因子的抑制剂且未能响应于一种或多种针对所述凝血因子的先前免疫耐受性疗法。

4. 如权利要求3所述的用途,其中在免疫耐受性之后,向所述人类施用包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白的减量方案。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的用途,其中包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白包含因子VIII-Fc (FVIII-Fc) 或因子IX-Fc (FIXFc)。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的用途,其中施用包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白直至观察到免疫耐受性,其中当所述人类中所述抑制性抗体的效价小于约0.6 BU时观察到免疫耐受性。

7. 如权利要求1、2和4至6中任一项所述的用途,其中所述减量方案包括施用减量剂量约50 IU/kg至约100 IU/kg的包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白。

8. 如权利要求1、2和4至7中任一项所述的用途,其中所述减量剂量一日一次、每隔一日一次或每周三次施用。

9. 如权利要求1、2和4至8中任一项所述的用途,其中所述减量剂量施用至少约1周、至少约2周、至少约3周、至少约4周、至少约5周、至少约6周、至少约7周、至少约8周、至少约9周、至少约10周、至少约11周、至少约12周、至少约13周、至少约14周、至少约15周、至少约16周、至少约17周、至少约18周、至少约19周、至少约20周、至少约21周、至少约22周、至少约23周、至少约24周、至少约25周、至少约26周、至少约27周、至少约28周、至少约29周、至少约30周、至少约31周或至少约32周。

10. 如权利要求1、2和4至9中任一项所述的用途,其中所述减量方案包括在免疫耐受性之后从第1周至第6周一日一次施用减量剂量约50 IU/kg的包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白,或在免疫耐受性之后从第1周至第6周一日一次施用减量剂量约100 IU/kg的所述嵌合蛋白。

11. 如权利要求10所述的用途,其中所述减量方案还包括在免疫耐受性之后从第6周至第12周每隔一日一次施用减量剂量约50IU/kg或约100 IU/kg的包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白,和/或从第12周至第16周每隔一日一次施用减量剂量约50 IU/kg或约100 IU/kg的所述嵌合蛋白。

12. 如权利要求1、2和4至11中任一项所述的用途,其还包括在所述减量方案之后施用

预防剂量的包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白。

13. 如权利要求1至12中任一项所述的用途,其中耐受性时间少于约24周、少于约23周、少于约22周、少于约21周、少于约20周、少于约19周、少于约18周、少于约17周、少于约16周、少于约15周、少于约14周、少于约13周、少于约12周、少于约11周、少于约10周、少于约9周、少于约8周、少于约7周、少于约6周、少于约5周、少于约4周、少于约3周、少于约2周或少于约1周。

14. 如权利要求5至13中任一项所述的用途,其中所述FVIII包括B结构域缺失FVIII。

15. 如权利要求1至14中任一项所述的用途,其中与在用单独凝血因子治疗之后人类的耐受性时间相比,包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白的所述施用导致所述人类的耐受性时间更短。

诱导对凝血因子的免疫耐受性的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年12月2日提交的美国临时申请序列第62/429,516号、2017年3月3日提交的美国临时申请序列第62/466,937号、2017年7月7日提交的美国临时申请序列第62/529,866号、2017年9月14日提交的美国临时申请序列第62/558,790号和2017年11月7日提交的美国临时申请序列第62/582,829号的权益,所述申请各自以全文引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本公开大体上涉及用于止血障碍的治疗剂的领域。

背景技术

[0004] 血友病为由编码凝血蛋白的基因,特别是因子VIII (FVIII) 基因(其导致缺乏FVIII活性(A型血友病))或因因子IX基因(其导致缺乏FIX活性(B型血友病))的突变和/或缺失造成的X连锁性出血病症(参见例如Peyvandi, F.等Haemophilia 12:82-89(2006))。所述疾病的特征在于自发性流血和创伤后过量出血。血友病的治疗为通过使FVIII和/或FIX活性恢复以防止自发性出血为目标的替代疗法进行(参见例如Mannucci, P.M.,等, N.Engl. J. Med. 344:1773-1779(2001))。

[0005] 凝血因子替代疗法为血友病的主导治疗。然而,大部分血友病患者(包括几乎30%患有重度A型血友病的患者)产生针对凝血因子产物的抑制剂,极大降低其在这些患者中的功效。免疫反应为针对输注的凝血因子的T细胞依赖性或B细胞介导的免疫反应,例如FVIII替代疗法。

[0006] 尽管患有重度血友病的人更可能产生抑制剂,但是近似5-8%患有轻度或中度A型血友病的人产生抑制剂。凝血因子抑制剂的产生可能为致命的,因为抗体可能不仅抑制输注的因子浓缩物,而且还抑制任何小百分比的体内天然产生的因子蛋白。因此,现在产生抑制剂的患有轻度或中度血友病的人实际上患有重度血友病(<1%循环因子)。

[0007] 近似2-3%患有B型血友病的人产生抑制剂。尽管患有B型血友病的人的抑制剂相比于A型血友病较不常见,但是其可能甚至更具挑战性,因为约一半B型血友病抑制剂患者将产生对输注因子IX的过敏性反应,这可能威胁生命。

[0008] 因此,仍需要诱导已产生对一种或多种凝血因子的免疫反应且尚未响应于先前免疫耐受性疗法的人类的免疫耐受性的方法。

发明内容

[0009] 本公开提供一种诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用有效量的包含凝血因子和Fc区的嵌合蛋白或包含凝血因子和Fc区的组合物,其中所述人类已产生针对所述凝血因子的抑制剂并且未能响应于一种或多种针对所述凝血因子的先前免疫耐受性疗法。在一些方面中,所述方法还包括在施用之前测量抑制性免疫反应的

水平并在施用之后测量抑制性免疫反应的水平。在一些方面中,所述方法还包括将施用之前的抑制性免疫反应的水平与施用之后的抑制性免疫反应的水平进行比较。

[0010] 本发明进一步提供一种诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括(1)向所述人类施用有效量的包含凝血因子和Fc区的嵌合蛋白或包含凝血因子和Fc区的组合物,其中所述有效量的所述嵌合蛋白诱导所述人类的免疫耐受性;以及(2)在诱导免疫耐受性之后,向所述人类施用所述嵌合蛋白的减量方案。在某些方面中,当人类的抑制性抗体的效价小于约0.6BU时发生免疫耐受性的诱导。在某些方面中,所述方法还包括(3)在所述减量方案之后,向所述人类施用预防剂量所述凝血因子。在某些方面中,所述人类尚未用针对所述凝血因子的先前免疫耐受性疗法治疗。

[0011] 在一些方面中,人类已产生对所述凝血因子的抑制性免疫反应。在一些实施方案中,所述抑制性免疫反应包括产生针对所述凝血因子的抑制性抗体。在一些实施方案中,所述抑制性抗体的效价在施用之前为至少约0.6个贝塞斯达单位(Bethesda Units, BU)。在一些实施方案中,所述抑制性抗体的效价在施用之后为小于约0.6BU。

[0012] 在一些方面中,所述免疫反应包括细胞介导的免疫反应。在一些实施方案中,所述细胞介导免疫反应包括细胞因子的释放。在一些实施方案中,与利用由FVIII多肽组成的多肽进行先前治疗之后人类中的水平相比,所述施用降低所述人类中的细胞因子水平。在一些实施方案中,所述细胞因子选自由以下组成的组:IL-12、IL-4、IL-17、TNF- α 及其任何组合。

[0013] 在某些方面中,相对于施用之前一种或多种致耐受性分子的表达水平,所述一种或多种致耐受性分子的表达在施用之后有所增加。在一些实施方案中,所述一种或多种致耐受性分子选自IL-10、TGF- β 、IL-35、IDO-1及其任何组合。在其他实施方案中,所述免疫反应包括选自由以下组成的组的临床症状:出血倾向增加、凝血因子消耗高、缺乏对凝血因子疗法的反应、凝血因子疗法的功效减小以及凝血因子的半衰期缩短。

[0014] 在一些实施方案中,所述人类先前被诊断为在施用之前至少约1个月、至少约2个月、至少约3个月、至少约6个月、至少约12个月、至少约18个月、至少约24个月、至少约30个月、至少约36个月、至少约42个月、至少约48年、至少约54个月、至少约60个月、至少约6年、至少约7年、至少约8年或至少约10年已产生对所述凝血因子的抑制性免疫反应。在一些实施方案中,耐受性时间为约1至约24周、约1至约23周、约1至约22周、约1至约21周、约2至约20周、约2至约19周、约2至约18周、约2至约17周、约3至约16周、约3至约15周、约3至约14周、约3至约13周、约4至约12周、约4至约11周、约4至约10周、约4至约9周、约5至约8周、约5至约7周、约5至约6周、约1至约12周、约1至约11周、约1至约10周、约1至约9周、约1至约8周、约1至约7周、约1至约6周、约1至约5周或约1至约4周。

[0015] 在一些方面中,所述凝血因子为因子VIII(FVIII)。在一些实施方案中,所述嵌合蛋白包含FVIII-Fc。在某些实施方案中,所述嵌合蛋白包含FVIII部分和VWF部分,其中所述FVIII部分包含FVIII多肽或其片段,其中所述VWF部分包含VWF多肽或其片段,其中所述FVIII部分连接至第一Fc区,其中所述VWF部分连接至第二Fc区,并且其中所述第一Fc区和所述第二Fc区彼此缔合。

[0016] 在一些方面中,所述嵌合蛋白还包含半衰期延长部分。在某些实施方案中,所述半衰期延长部分包含白蛋白或其片段、白蛋白结合部分、PAS序列、HAP序列、转铁蛋白或其片

段、聚乙二醇(PEG)、聚唾液酸、羟乙基淀粉(HES)、其衍生物或其任何组合。

[0017] 在一些实施方案中,包含FVIII和Fc区的所述嵌合蛋白的有效量为约20IU/kg至约300IU/kg。在一些实施方案中,包含FVIII-Fc的所述嵌合蛋白以以下给药间隔施用:约一日、约两日、约三日、约四日、约五日、约六日、约七日、约八日、约九日、约十日、约十一日、约十二日、约十三日、约十四日、约十五日、约十六日、约十七日、约十八日、约十九日、约二十日、约二十一日、约二十二日、约二十三日或约二十四日。

[0018] 在某些方面中,所述人类先前产生FVIII抑制性免疫反应。在一些实施方案中,所述人类患有选自由以下组成的组的出血病状:出血凝血障碍、关节积血、肌肉出血、口腔出血、流血、向肌肉中流血、口腔流血、创伤、头创伤、胃肠出血、颅内流血、腹内流血、胸内流血、骨折、中枢神经系统出血、咽后间隙中出血、腹膜后隙中出血和髂腰肌鞘中出血。

[0019] 实施方案

[0020] E1.一种诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用有效量的包含凝血因子和Fc区的嵌合蛋白,其中所述人类已产生针对所述凝血因子的抑制剂且未能响应于一种或多种针对所述凝血因子的先前免疫耐受性疗法。

[0021] E2.如E1所述的方法,其还包括在施用之前测量抑制性免疫反应的水平并在施用之后测量抑制性免疫反应的水平。

[0022] E3.如E2所述的方法,其还包括将施用之前的抑制性免疫反应的水平与施用之后的抑制性免疫反应的水平进行比较。

[0023] E4.如E1至E3中任一项所述的方法,其中所述人类已产生对所述凝血因子的抑制性免疫反应。

[0024] E5.如E4所述的方法,其中所述抑制性免疫反应包括产生针对所述凝血因子的抑制性抗体。

[0025] E6.如E5所述的方法,其中所述抑制性抗体的效价在施用之前为至少约0.6个贝塞斯达单位(BU)。

[0026] E7.如E5或E6所述的方法,其中所述抑制性抗体的效价在所述施用之前为至少约1BU、至少约2BU、至少约3BU、至少约4BU、至少约5BU、至少约6BU、至少约7BU、至少约10BU、至少约20BU、至少约30BU、至少约40BU、至少约50BU、至少约100BU、至少约150BU或至少约200BU。

[0027] E8.如E5至E7中任一项所述的方法,其中所述抑制性抗体的效价在施用之前为至少约5BU。

[0028] E9.如E5至E8中任一项所述的方法,其中所述抑制性抗体的效价在施用之后为小于约0.6BU。

[0029] E10.如E5至E9中任一项所述的方法,其中所述抑制性抗体的效价在施用之后为0BU。

[0030] E11.如E1至E10中任一项所述的方法,其中所述免疫反应包括细胞介导的免疫反应。

[0031] E12.如E11所述的方法,其中所述细胞介导免疫反应包括细胞因子的释放。

[0032] E13.如E12所述的方法,其中与利用由FVIII多肽组成的多肽进行先前治疗之后所述人类的水平相比,所述施用降低所述人类的细胞因子的水平。

[0033] E14. 如E12或E13所述的方法,其中所述细胞因子选自由以下组成的组:IL-12、IL-4、IL-17、TNF- α 及其任何组合。

[0034] E15. 如E1至E14中任一项所述的方法,其中相对于所述施用之前一种或多种致耐受性分子的表达水平,所述一种或多种致耐受性分子的表达在所述施用之后有所增加。

[0035] E16. 如E15所述的方法,其中所述一种或多种致耐受性分子选自IL-10、TGF- β 、IL-35、IDO-1及其任何组合。

[0036] E17. 如E1至E14中任一项所述的方法,其中所述免疫反应包括选自由以下组成的组的临床症状:出血倾向增加、凝血因子消耗高、缺乏对凝血因子疗法的反应、凝血因子疗法的功效减小和凝血因子的半衰期缩短。

[0037] E18. 如E1至E17中任一项所述的方法,其中所述人类先前被诊断为在所述施用之前至少约3个月、至少约6个月、至少约12个月、至少约18个月、至少约24个月、至少约30个月、至少约36个月、至少约42个月、至少约48个月、至少约54个月、至少约60个月、至少约6年、至少约7年、至少约8年或至少约10年已产生对所述凝血因子的抑制性免疫反应。

[0038] E19. 如E1至E18中任一项所述的方法,其中所述人类先前被诊断为在所述施用之前至少约5年已产生对所述凝血因子的抑制性免疫反应。

[0039] E20. 如E1至E19中任一项所述的方法,其中所述耐受性时间为约1至约24周、约1至约23周、约1至约22周、约1至约21周、约2至约20周、约2至约19周、约2至约18周、约2至约17周、约3至约16周、约3至约15周、约3至约14周、约3至约13周、约4至约12周、约4至约11周、约4至约10周、约4至约9周、约5至约8周、约5至约7周、约5至约6周、约1至约12周、约1至约11周、约1至约10周、约1至约9周、约1至约8周、约1至约7周、约1至约6周、约1至约5周或约1至约4周。

[0040] E21. 如E1至E20中任一项所述的方法,其中所述耐受性时间少于约24周、少于约23周、少于约22周、少于约21周、少于约20周、少于约19周、少于约18周、少于约17周、少于约16周、少于约15周、少于约14周、少于约13周、少于约12周、少于约11周、少于约10周、少于约9周、少于约8周、少于约7周、少于约6周、少于约5周、少于约4周、少于约3周、少于约2周或少于约1周。

[0041] E22. 如E1至E21中任一项所述的方法,其中所述耐受性时间为约4至约12周。

[0042] E23. 如E1至E22中任一项所述的方法,其中所述耐受性时间为约4周。

[0043] E24. 如E1至E23中任一项所述的方法,其中所述人类正接受干扰素疗法。

[0044] E25. 如E1至E24中任一项所述的方法,其中所述人类正接受抗病毒疗法。

[0045] E26. 如E1至E25中任一项所述的方法,其中所述人类具有与增加的TNF- α 相关联的遗传多态性。

[0046] E27. 如E26所述的方法,其中所述多态性为TNF-308G>A。

[0047] E28. 如E1至E27中任一项所述的方法,其中所述人类具有与增加的IL10相关联的遗传多态性。

[0048] E29. 如E28所述的方法,其中所述多态性为IL10G微卫星的等位基因134。

[0049] E30. 如E1至E29中任一项所述的方法,其中所述人类已具有对所述凝血因子的小于150个暴露日(ED)。

[0050] E31. 如E30所述的方法,其中所述人类已具有小于50ED。

- [0051] E32. 如E31所述的方法,其中所述人类已具有小于20ED。
- [0052] E33. 如E1至E32中任一项所述的方法,其中所述凝血因子为因子VIII (FVIII)。
- [0053] E34. 如E1至E33中任一项所述的方法,其中所述嵌合蛋白包含FVIII-Fc。
- [0054] E35. 如E1至E34中任一项所述的方法,其中所述嵌合蛋白包含FVIII部分和VWF部分,其中所述FVIII部分包含FVIII多肽或其片段,其中所述VWF部分包含VWF多肽或其片段,其中所述FVIII部分连接至第一Fc区,其中所述VWF部分连接至第二Fc区,并且其中所述第一Fc区和所述第二Fc区彼此缔合。
- [0055] E36. 如E33至E35中任一项所述的方法,其中所述FVIII多肽包括成熟FVIII。
- [0056] E37. 如E33至E35中任一项所述的方法,其中所述FVIII多肽包括B结构域缺失FVIII。
- [0057] E38. 如E37所述的方法,其中所述B结构域缺失FVIII包含FVIII的所有或部分所述B结构域的缺失。
- [0058] E39. 如E37或E38所述的方法,其中所述B结构域缺失FVIII包含成熟FVIII的氨基酸残基746至1648的缺失。
- [0059] E40. 如E33至E39中任一项所述的方法,其中所述VWF多肽包含含有VWF的D' 结构域和D3结构域的VWF片段。
- [0060] E41. 如E1至E40中任一项所述的方法,其中所述嵌合蛋白还包含半衰期延长部分。
- [0061] E42. 如E41所述的方法,其中所述半衰期延长部分包含白蛋白或其片段、白蛋白结合部分、PAS序列、HAP序列、转铁蛋白或其片段、聚乙二醇 (PEG)、聚唾液酸、羟乙基淀粉 (HES)、其衍生物或其任何组合。
- [0062] E43. 如E41或E42所述的方法,其中所述半衰期延长部分被插入在所述凝血因子内。
- [0063] E44. 如E41或E42所述的方法,其中所述半衰期延长部分被插入在所述凝血因子与所述Fc区之间。
- [0064] E45. 如E33至E44中任一项所述的方法,其中包含FVIII和Fc区的所述嵌合蛋白的所述有效量为约20IU/kg至约300IU/kg。
- [0065] E46. 如E45所述的方法,其中包含FVIII-Fc的所述嵌合蛋白的所述有效量为约100IU/kg至约300IU/kg、约100IU/kg至约200IU/kg、约100IU/kg至约290IU/kg、约100IU/kg至约280IU/kg、约100IU/kg至约270IU/kg、约100IU/kg至约260IU/kg、约100IU/kg至约250IU/kg、约100IU/kg至约240IU/kg、约100IU/kg至约230IU/kg、约100IU/kg至约220IU/kg、约100IU/kg至约210IU/kg、约150IU/kg至约300IU/kg、约150IU/kg至约290IU/kg、约150IU/kg至约280IU/kg、约150IU/kg至约270IU/kg、约150IU/kg至约260IU/kg、约150IU/kg至约250IU/kg、约150IU/kg至约240IU/kg、约140IU/kg至约250IU/kg、约130IU/kg至约260IU/kg、约120IU/kg至约270IU/kg、约110IU/kg至约280IU/kg、约200IU/kg至约290IU/kg、约200IU/kg至约280IU/kg、约200IU/kg至约270IU/kg、约200IU/kg至约260IU/kg、约200IU/kg至约250IU/kg、约200IU/kg至约240IU/kg、约200IU/kg至约230IU/kg、约200IU/kg至约220IU/kg或约200IU/kg至约210IU/kg。
- [0066] E47. 如E45或E46所述的方法,其中包含FVIII-Fc的所述嵌合蛋白的所述有效量为约100IU/kg、约105IU/kg、约110IU/kg、约115IU/kg、约120IU/kg、约125IU/kg、约130IU/kg、

约135IU/kg、约140IU/kg、约145IU/kg、约150IU/kg、约155IU/kg、约160IU/kg、约165IU/kg、约170IU/kg、约175IU/kg、约180IU/kg、约185IU/kg、约190IU/kg、约195IU/kg、约200IU/kg、约225IU/kg、约250IU/kg、约275IU/kg或约300IU/kg。

[0067] E48. 如E33至E47中任一项所述的方法,其中包含FVIII-Fc的所述嵌合蛋白以以下给药间隔施用:约两日、约三日、约四日、约五日、约六日、约七日、约八日、约九日、约十日、约十一日、约十二日、约十三日、约十四日、约十五日、约十六日、约十七日、约十八日、约十九日、约二十日、约二十一日、约二十二日、约二十三日或约二十四日。

[0068] E49. 如E33至E47中任一项所述的方法,其中包含FVIII-Fc的所述嵌合蛋白以以下给药间隔施用:约1至约14日、约1至约13日、约1至约12日、约1至约11日、约1至约10日、约1至约9日、约1至约8日、约1至约7日、约1至约6日、约1至约5日、约1至约4日、约1至约3日、约1至约2日、约2至约14日、约3至约14日、约4至约14日、约5至约14日、约6至约14日、约7至约14日、约8至约14日、约9至约14日、约10至约14日、约11至约14日、约12至约14日、约13至约14日或约5至约10日。

[0069] E50. 如E33至E49中任一项所述的方法,其中包含FVIII-Fc的所述嵌合蛋白以约3日至约5日的给药间隔施用。

[0070] E51. 如E1至E33中任一项所述的方法,其中所述嵌合蛋白包含FVIII部分、VWF部分、第一Fc区和第二Fc区;

[0071] 其中所述FVIII部分包含FVIII多肽或其片段;

[0072] 其中所述VWF部分包含VWF多肽或其片段;

[0073] 其中所述FVIII部分连接至所述第一Fc区;

[0074] 其中所述VWF部分连接至所述第二Fc区;并且

[0075] 其中所述第一Fc区和所述第二Fc区彼此缔合。

[0076] E52. 如E1至E51中任一项所述的方法,其中所述人类先前产生FVIII抑制性免疫反应。

[0077] E53. 如E52所述的方法,其中所述抑制性FVIII免疫反应响应于选自由以下组成的组的FVIII产品而产生: ADVATE®、RECOMBINATE®、KOGENATE FS®、HELIXATE FS®、XYNTHA/REFACTO AB®、HEMOFIL-M®、MONARC-M®、MONOCLATE-P®、HUMATE-P®、ALPHANATE®、KOATE-DVI®、AFSTYLA®和HYATE:C®。

[0078] E54. 如E52所述的方法,其中所述抑制性FVIII免疫反应响应于重组FVIII产品而产生。

[0079] E55. 如E1至E54中任一项所述的方法,其中所述人类患有选自由以下组成的组的出血病状: 出血凝血障碍、关节积血、肌肉出血、口腔出血、流血、向肌肉中流血、口腔流血、创伤、头创伤、胃肠出血、颅内流血、腹内流血、胸内流血、骨折、中枢神经系统出血、咽后间隙中出血、腹膜后隙中出血和髂腰肌鞘中出血。

[0080] E56. 如E55所述的方法,其中所述出血凝血障碍为A型血友病。

[0081] 57. 如E33至E56中任一项所述的方法,其中包含FVIII和Fc区的所述嵌合蛋白的所述有效量为约50IU/kg至约300IU/kg。

[0082] E58. 如E57所述的方法,其中包含FVIII和Fc区的所述嵌合蛋白的所述有效量为约50IU/kg、约60IU/kg、约70IU/kg、约80IU/kg、约90IU/kg、约100IU/kg、约110IU/kg、约

120IU/kg、约130IU/kg、约140IU/kg、约150IU/kg、约160IU/kg、约170IU/kg、约180IU/kg、约190IU/kg、约200IU/kg、约225IU/kg、约250IU/kg、约275IU/kg或约300IU/kg。

[0083] E59. 如E57或E58所述的方法,其中所述嵌合蛋白的所述有效量为约200IU/kg并且每日施用。

[0084] E60. 如E57或E58所述的方法,其中所述嵌合蛋白的所述有效量为约50IU/kg并且一周施用约三次。

[0085] E61. 如E57至E60中任一项所述的方法,其中所述有效量所述嵌合蛋白以全天二个或更多个剂量施用。

[0086] E62. 如E57至E61中任一项所述的方法,其中施用所述嵌合蛋白直至观察到免疫耐受性,其中当所述人类中所述抑制性抗体的效价小于约0.6BU时观察到免疫耐受性。

[0087] E63. 如E62所述的方法,其中在免疫耐受性之后,向所述人类施用包含FVIII和Fc区的所述嵌合蛋白的减量方案。

[0088] E64. 如E63所述的方法,其中所述减量方案包括施用减量剂量约50IU/kg至约100IU/kg的包含FVIII和Fc区的所述嵌合蛋白。

[0089] E65. 如E63或E64所述的方法,其中所述减量剂量为一日一次或每隔一日一次施用。

[0090] E66. 如E63至E65中任一项所述的方法,其中所述减量剂量施用至少约1周、至少约2周、至少约3周、至少约4周、至少约5周、至少约6周、至少约7周、至少约8周、至少约9周、至少约10周、至少约11周、至少约12周、至少约13周、至少约14周、至少约15周、至少约16周、至少约17周、至少约18周、至少约19周、至少约20周、至少约21周、至少约22周、至少约23周、至少约24周、至少约25周、至少约26周、至少约27周、至少约28周、至少约29周、至少约30周、至少约31周或至少约32周。

[0091] E67. 如E63至E66中任一项所述的方法,其中所述减量方案包括施用减量剂量约50IU/kg或约100IU/kg的所述嵌合蛋白。

[0092] E68. 如E63至E67中任一项所述的方法,其中所述减量方案包括在免疫耐受性之后从第1周至第6周一日一次施用减量剂量约50IU/kg的所述嵌合蛋白。

[0093] E69. 如E63至E67中任一项所述的方法,其中所述减量方案包括在免疫耐受性之后从第1周至第6周一日一次施用减量剂量约100IU/kg的所述嵌合蛋白。

[0094] E70. 如E68或E69所述的方法,其中所述减量方案还包括在免疫耐受性之后从第6周至第12周每隔一日一次施用减量剂量约50IU/kg或约100IU/kg的所述嵌合蛋白。

[0095] E71. 如E70所述的方法,其中所述减量方案还包括从第12周至第16周每隔一日一次施用减量剂量约50IU/kg或约100IU/kg的所述嵌合蛋白。

[0096] E72. 如E66至E71中任一项所述的方法,其还包括在减量方案之后施用预防剂量的所述凝血因子。

[0097] E73. 如E72所述的方法,其中所述预防剂量包括约50IU/kg至约100IU/kg。

[0098] E74. 如E72或E73所述的方法,其中所述预防剂量为每周约一次、每周约两次、每周约三次或每三至五日约一次施用。

[0099] E75. 一种诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括

[0100] (1) 向所述人类施用有效量的包含凝血因子和Fc区的嵌合蛋白,其中所述有效量

的包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白诱导所述人类的免疫耐受性;以及

[0101] (2) 在诱导免疫耐受性之后,向所述人类施用所述嵌合蛋白的减量方案。

[0102] E76. 如E75所述的方法,其中当所述人类的所述抑制性抗体的效价小于约0.6BU时发生免疫耐受性的诱导。

[0103] E77. 如E75或E77所述的方法,其还包括:

[0104] (3) 在所述减量方案之后,向所述人类施用预防剂量的凝血因子。

[0105] E78. 如E75至E77中任一项所述的方法,其中所述人类尚未用针对所述凝血因子的先前免疫耐受性疗法治疗。

[0106] E79. 如E75至E78中任一项所述的方法,其还包括在施用之前测量抑制性免疫反应的水平并在施用之后测量抑制性免疫反应的水平。

[0107] E80. 如E79所述的方法,其还包括将施用之前的抑制性免疫反应的水平与施用之后的抑制性免疫反应的水平进行比较。

[0108] E81. 如E75至E80中任一项所述的方法,其中所述人类已产生对所述凝血因子的抑制性免疫反应。

[0109] E82. 如E81所述的方法,其中所述抑制性免疫反应包括产生针对所述凝血因子的抑制性抗体。

[0110] E83. 如E82所述的方法,其中所述抑制性抗体的效价在施用之前为至少约0.6个贝塞斯达单位(BU)。

[0111] E84. 如E82或E83所述的方法,其中所述抑制性抗体的效价在所述施用之前为至少约1BU、至少约2BU、至少约3BU、至少约4BU、至少约5BU、至少约6BU、至少约7BU、至少约10BU、至少约20BU、至少约30BU、至少约40BU、至少约50BU、至少约100BU、至少约150BU或至少约200BU。

[0112] E85. 如E82至E84中任一项所述的方法,其中所述抑制性抗体的效价在施用之前为至少约5BU。

[0113] E86. 如E82至E85中任一项所述的方法,其中所述抑制性抗体的效价在施用之后为小于约0.6BU。

[0114] E87. 如E82至E86中任一项所述的方法,其中所述抑制性抗体的效价在施用之后为0BU。

[0115] E88. 如E79至E87中任一项所述的方法,其中所述免疫反应包括细胞介导的免疫反应。

[0116] E89. 如E88所述的方法,其中所述细胞介导免疫反应包括细胞因子的释放。

[0117] E90. 如E88所述的方法,其中与利用由FVIII多肽组成的多肽的先前治疗之后所述人类的水平相比,所述施用降低所述人类的细胞因子的水平。

[0118] E91. 如E75至E90中任一项所述的方法,其中相对于所述施用之前一种或多种致耐受性分子的表达水平,所述一种或多种致耐受性分子的表达在所述施用之后有所增加。

[0119] E92. 如E75至E91中任一项所述的方法,其中所述人类先前被诊断为在所述施用之前至少约3个月、至少约6个月、至少约12个月、至少约18个月、至少约24个月、至少约30个月、至少约36个月、至少约42个月、至少约48年、至少约54个月、至少约60个月、至少约6年、至少约7年、至少约8年或至少约10年已产生对所述凝血因子的抑制性免疫反应。

[0120] E93. 如E75至E92中任一项所述的方法, 其中所述人类先前被诊断为在所述施用之前至少约5年已产生对所述凝血因子的抑制性免疫反应。

[0121] E94. 如E75至E93中任一项所述的方法, 其中所述耐受性时间为约1至约24周、约1至约23周、约1至约22周、约1至约21周、约2至约20周、约2至约19周、约2至约18周、约2至约17周、约3至约16周、约3至约15周、约3至约14周、约3至约13周、约4至约12周、约4至约11周、约4至约10周、约4至约9周、约5至约8周、约5至约7周、约5至约6周、约1至约12周、约1至约11周、约1至约10周、约1至约9周、约1至约8周、约1至约7周、约1至约6周、约1至约5周或约1至约4周。

[0122] E95. 如E75至E94中任一项所述的方法, 其中所述耐受性时间少于约24周、少于约23周、少于约22周、少于约21周、少于约20周、少于约19周、少于约18周、少于约17周、少于约16周、少于约15周、少于约14周、少于约13周、少于约12周、少于约11周、少于约10周、少于约9周、少于约8周、少于约7周、少于约6周、少于约5周、少于约4周、少于约3周、少于约2周或少于约1周。

[0123] E96. 如E75至E95中任一项所述的方法, 其中所述耐受性时间为约4至约12周。

[0124] E97. 如E75至E96中任一项所述的方法, 其中所述耐受性时间为约4周。

[0125] E98. 如E75至E97中任一项所述的方法, 其中所述人类正接受干扰素疗法。

[0126] E99. 如E75至E98中任一项所述的方法, 其中所述人类正接受抗病毒疗法。

[0127] E100. 如E75至E91中任一项所述的方法, 其中所述人类具有与增加的TNF- α 相关联的遗传多态性。

[0128] E101. 如E100所述的方法, 其中所述多态性为TNF-308G>A。

[0129] E102. 如E75至E101中任一项所述的方法, 其中所述人类具有与增加的IL10相关联的遗传多态性。

[0130] E103. 如E102所述的方法, 其中所述多态性为IL10G微卫星的等位基因134。

[0131] E104. 如E75至E103中任一项所述的方法, 其中所述人类已具有对所述凝血因子的小于150个暴露日(ED)。

[0132] E105. 如E104所述的方法, 其中所述人类已具有小于50ED。

[0133] E106. 如E105所述的方法, 其中所述人类已具有小于20ED。

[0134] E107. 如E75至E106中任一项所述的方法, 其中所述凝血因子为因子FVIII (FVIII)。

[0135] E108. 如E75至E107中任一项所述的方法, 其中所述嵌合蛋白包含FVIII-Fc。

[0136] E109. 如E75至E108中任一项所述的方法, 其中所述嵌合蛋白包含FVIII部分和VWF部分, 其中所述FVIII部分包含FVIII多肽或其片段, 其中所述VWF部分包含VWF多肽或其片段, 其中所述FVIII部分连接至第一Fc区, 其中所述VWF部分连接至第二Fc区, 并且其中所述第一Fc区和所述第二Fc区彼此缔合。

[0137] E110. 如E75至E109中任一项所述的方法, 其中所述FVIII多肽包括成熟FVIII。

[0138] E111. 如E75至E109中任一项所述的方法, 其中所述FVIII多肽包括B结构域缺失FVIII。

[0139] E112. 如E110所述的方法, 其中所述B结构域缺失FVIII包含FVIII的所有或部分所述B结构域的缺失。

[0140] E113. 如E110或E111所述的方法, 其中所述B结构域缺失FVIII包含成熟FVIII的氨

基酸残基746至1648的缺失。

[0141] E114. 如E109至E113中任一项所述的方法,其中所述VWF多肽包含含有VWF的D'结构域和D3结构域的VWF片段。

[0142] E115. 如E75至E114中任一项所述的方法,其中所述嵌合蛋白还包含半衰期延长部分。

[0143] E116. 如E115所述的方法,其中所述半衰期延长部分包含白蛋白或其片段、白蛋白结合部分、PAS序列、HAP序列、转铁蛋白或其片段、聚乙二醇(PEG)、聚唾液酸、羟乙基淀粉(HES)、其衍生物或其任何组合。

[0144] E116. 如E115或E116所述的方法,其中所述半衰期延长部分被插入在所述凝血因子内。

[0145] E117. 如E115或E116所述的方法,其中所述半衰期延长部分被插入在所述凝血因子与所述Fc区之间。

[0146] E118. 如E75至E118中任一项所述的方法,其中包含FVIII和Fc区的所述嵌合蛋白的所述有效量为约50IU/kg至约300IU/kg。

[0147] E120. 如E119所述的方法,其中包含FVIII-Fc的所述嵌合蛋白的所述有效量为约100IU/kg至约300IU/kg、约100IU/kg至约200IU/kg、约100IU/kg至约290IU/kg、约100IU/kg至约280IU/kg、约100IU/kg至约270IU/kg、约100IU/kg至约260IU/kg、约100IU/kg至约250IU/kg、约100IU/kg至约240IU/kg、约100IU/kg至约230IU/kg、约100IU/kg至约220IU/kg、约100IU/kg至约210IU/kg、约150IU/kg至约300IU/kg、约150IU/kg至约290IU/kg、约150IU/kg至约280IU/kg、约150IU/kg至约270IU/kg、约150IU/kg至约260IU/kg、约150IU/kg至约250IU/kg、约150IU/kg至约240IU/kg、约140IU/kg至约250IU/kg、约130IU/kg至约260IU/kg、约120IU/kg至约270IU/kg、约110IU/kg至约280IU/kg、约200IU/kg至约290IU/kg、约200IU/kg至约280IU/kg、约200IU/kg至约270IU/kg、约200IU/kg至约260IU/kg、约200IU/kg至约250IU/kg、约200IU/kg至约240IU/kg、约200IU/kg至约230IU/kg、约200IU/kg至约220IU/kg或约200IU/kg至约210IU/kg。

[0148] E121. 如E119或E120所述的方法,其中包含FVIII-Fc的所述嵌合蛋白的所述有效量为约50IU/kg、约60IU/kg、约70IU/kg、约80IU/kg、约90IU/kg、约100IU/kg、约110IU/kg、约120IU/kg、约130IU/kg、约140IU/kg、约150IU/kg、约160IU/kg、约170IU/kg、约180IU/kg、约190IU/kg、约200IU/kg、约225IU/kg、约250IU/kg、约275IU/kg或约300IU/kg。

[0149] E122. 如E75至E121中任一项所述的方法,其中所述嵌合蛋白的所述有效量为约200IU/kg并且每日施用。

[0150] E123. 如E75至E122中任一项所述的方法,其中包含FVIII-Fc的所述嵌合蛋白以以下给药间隔施用:约两日、约三日、约四日、约五日、约六日、约七日、约八日、约九日、约十日、约十一日、约十二日、约十三日、约十四日、约十五日、约十六日、约十七日、约十八日、约十九日、约二十日、约二十一日、约二十二日、约二十三日或约二十四日。

[0151] E124. 如E75至E121中任一项所述的方法,其中包含FVIII-Fc的所述嵌合蛋白以以下给药间隔施用:约1至约14日、约1至约13日、约1至约12日、约1至约11日、约1至约10日、约1至约9日、约1至约8日、约1至约7日、约1至约6日、约1至约5日、约1至约4日、约1至约3日、约1至约2日、约2至约14日、约3至约14日、约4至约14日、约5至约14日、约6至约14日、约7至约

14日、约8至约14日、约9至约14日、约10至约14日、约11至约14日、约12至约14日、约13至约14日或约5至约10日。

[0152] E125. 如E75至E122中任一项所述的方法, 其中包含FVIII-Fc的所述嵌合蛋白为以约3日至约5日的给药间隔施用。

[0153] E126. 如E75至E125中任一项所述的方法, 其中所述嵌合蛋白包含FVIII部分、VWF部分、第一Fc区和第二Fc区;

[0154] 其中所述FVIII部分包含FVIII多肽或其片段;

[0155] 其中所述VWF部分包含VWF多肽或其片段;

[0156] 其中所述FVIII部分连接至所述第一Fc区;

[0157] 其中所述VWF部分连接至所述第二Fc区; 且

[0158] 其中所述第一Fc区和所述第二Fc区彼此缔合。

[0159] E127. 如E75至E126中任一项所述的方法, 其中所述人类先前产生FVIII抑制性免疫反应。

[0160] E128. 如E127所述的方法, 其中所述抑制FVIII免疫反应响应于选自由以下组成的组的FVIII产品而产生: ADVATE®、RECOMBINATE®、KOGENATE FS®、HELIXATE FS®、XYNTHA/REFACTO AB®、HEMOPIL-M®、MONARC-M®、MONOCLATE-P®、HUMATE-P®、ALPHANATE®、KOATE-DVI®、AFSTYLA®和HYATE:C®。

[0161] E129. 如E128所述的方法, 其中所述抑制FVIII免疫反应响应于重组FVIII产品而产生。

[0162] E130. 如E75至E129中任一项所述的方法, 其中所述人类患有选自由以下组成的组的出血病状: 出血凝血障碍、关节积血、肌肉出血、口腔出血、流血、向肌肉中流血、口腔流血、创伤、头创伤、胃肠出血、颅内流血、腹内流血、胸内流血、骨折、中枢神经系统出血、咽后间隙中出血、腹膜后隙中出血和髂腰肌鞘中出血。

[0163] E131. 如E130所述的方法, 其中所述出血凝血障碍为A型血友病。

[0164] E132. 如E75至E131中任一项所述的方法, 其中所述有效量的所述嵌合蛋白以全天二或更多个剂量施用。

[0165] E133. 如E75至E132中任一项所述的方法, 其中所述减量方案包括施用减量剂量约50IU/kg至约100IU/kg所述嵌合蛋白。

[0166] E134. 如E75至E133中任一项所述的方法, 其中所述减量剂量一日一次、每隔一日一次或每周三次施用。

[0167] E135. 如E75至E134中任一项所述的方法, 其中所述减量剂量施用至少约1周、至少约2周、至少约3周、至少约4周、至少约5周、至少约6周、至少约7周、至少约8周、至少约9周、至少约10周、至少约11周、至少约12周、至少约13周、至少约14周、至少约15周、至少约16周、至少约17周、至少约18周、至少约19周、至少约20周、至少约21周、至少约22周、至少约23周、至少约24周、至少约25周、至少约26周、至少约27周、至少约28周、至少约29周、至少约30周、至少约31周或至少约32周。

[0168] E136. 如E74至E135中任一项所述的方法, 其中所述减量方案包括施用减量剂量约50IU/kg或约100IU/kg的所述嵌合蛋白。

[0169] E137. 如E75至E136中任一项所述的方法, 其中所述减量方案包括在免疫耐受性之

后从第1周至第6周一日一次施用减量剂量约50IU/kg的所述嵌合蛋白。

[0170] E138. 如E75至E136中任一项所述的方法,其中所述减量方案包括在免疫耐受性之后从第1周至第6周一日一次施用减量剂量约100IU/kg的所述嵌合蛋白。

[0171] E139. 如E137或E138所述的方法,其中所述减量方案还包括在免疫耐受性之后从第6周至第12周每隔一日一次施用减量剂量约50IU/kg或约100IU/kg的所述嵌合蛋白。

[0172] E140. 如E139所述的方法,其中所述减量方案还包括从第12周至第16周每隔一日一次施用减量剂量约50IU/kg或约100IU/kg的所述嵌合蛋白。

[0173] E141. 如E77至E140中任一项所述的方法,其中所述预防剂量包括约50IU/kg至约100IU/kg。

[0174] E142. 如E77至E141中任一项所述的方法,其中所述预防剂量每周约一次、每周约两次、每周约三次或每周约三次施用。

[0175] E143. 如E79至E91和94至E142中任一项所述的方法,其中包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白在测量所述人类的抑制性免疫反应之后小于约1日、小于约2日、小于约3日、小于约4日、小于约5日、小于约6日、小于约7日、小于约2周、小于约3周、小于约4周、小于约2个月、小于约3个月、小于约4个月、小于约5个月、小于约6个月或小于约1年向所述人类施用。

[0176] E144. 如E79至E91和94至E143中任一项所述的方法,其中包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白在测量所述人类的抑制性免疫反应的水平之后小于约1日向所述人类施用。

[0177] E145. 如E79至E91和94至E144中任一项所述的方法,其中包含凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白在测量所述人类的抑制性免疫反应的水平之后小于约12小时向所述人类施用。

[0178] E146. 如E1至E145中任一项所述的方法,其中与在用单独凝血因子治疗之后人类的耐受性时间相比,所述嵌合蛋白的所述施用导致所述人类的耐受性时间更短。

附图说明

[0179] 图1为流程图,其概述用于研究rFVIIIFc对Fc γ R结合、内化、信号传导和细胞因子产生的影响以及基因表达变化、以及随后体外在T细胞上的相互作用和影响所用的方法。

[0180] 图2A-2C为在用辣根过氧化物酶免疫复合物(HRP-IC; 阳性对照)、IgG1、重组FVIII(rFVIII)或rFVIII Fc融合蛋白(rFVIIIFc)处理之后Fc γ 受体CD16(图2A)、CD32(图2B)和CD64(图2C)的相对巨噬细胞和树突细胞表面表达水平的图形表示。星号(*)指示显著性程度($n=3$; **= $P\leq 0.01$, ***= $P\leq 0.005$, 未示出与其他处理相比的HRP-IC显著性)。

[0181] 图3A-3C为示出在用rFVIII或rFVIIIFc处理之后相对信号传导的图形表示。图3A示出如通过Syk磷酸化所测量,在用HRP-IC、IgG1、rFVIII或rFVIIIFc处理15分钟的THP-1单核细胞系(「THP-1」)、单核细胞、外周血单核细胞来源的巨噬细胞(「巨噬细胞」)和外周血单核细胞来源的树突细胞中的信号传导。图3B示出用rFVIIIFc(“WT”)、不能结合至新生Fc受体的突变rFVIIIFc(“FcRn突变体”)或不能结合至Fc γ R的突变rFVIIIFc(“Fc γ R突变体”)处理的巨噬细胞中的相对Syk磷酸化。图3C示出在用HRP-IC、IgG1、rFVIII或rFVIIIFc处理之后二十四小时巨噬细胞中促炎性细胞因子白介素1b(IL-1b)、IL-6、IL-8、IL-10和肿瘤坏死因子 α (TNF α)的相对产生。

[0182] 图4示出在用rFVIII或rFVIIIIFc处理之后一分钟、五分钟和三十分钟含Src同源区2结构域的磷酸酶-1 (SHP1)、pSHP2、磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸5-磷酸酶1 (SHIP1) 和pSHIP2的相对磷酸化状态。星号(*)指示显著性程度($n=3$; $**P\leq 0.01$, $***P\leq 0.005$)。

[0183] 图5A-5M为用rFVIII或rFVIIIIFc处理之后致耐受性巨噬细胞的基因表达模式的图形表示。图5A-5B为维恩图,其示出用IgG1、rFVIII或rFVIIIIFc处理六小时的单核细胞来源的巨噬细胞($n=3$)中显著下调的基因的分布(图5A)和显著上调的基因的分布(图5B)。图5C-5G为示出在用rFVIII或rFVIIIIFc处理之后,如通过定量PCR所测量,各种NRF2和脂质代谢途径基因的相对表达的图,所述基因诸如血红素氧化酶1(Hmox1;图5C)、过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ ;图5D)、脂蛋白脂肪酶(LPL;图5E)、早期生长反应2(EGR2;图5F)和溶质载体有机阴离子转运体家族成员4A1(SLC04A1;图5G);处理之后6小时(图5I)和12小时(图5J)的CD206;以及精氨酸酶1(ARG1;图5L)。星号(*)指示显著性程度($n=8$; $*P\leq 0.05$, $**P\leq 0.01$, $***P\leq 0.005$;图5C-5G)。图5K和5M为示出通过流式细胞术收集的表达CD206的细胞数的图。此外,发现rFVIIIIFc处理的巨噬细胞展现特征性M2样表型(图5I-5M)。具体而言,用rFVIIIIFc处理的巨噬细胞具有比6小时(图5I)之后和24小时(图5J)之后用rFVIII处理的细胞高的相对CD206(也称为甘露糖受体C型1;MRC1)表达,并且用rFVIIIIFc处理的巨噬细胞具有比24小时之后用rFVIII处理的细胞高的相对ARG1表达(图5M)。

[0184] 图6A为示出用于确定rFVIIIIFc处理对T细胞分化的作用的方法的流程图。图6B为将巨噬细胞或树突细胞以IgG1(对照)、rFVIII或rFVIIIIFc处理24小时并且然后与原初CD4阳性T细胞进行共培养之后六日调控性T细胞的百分比的图形表示。图6C为将原初CD4阳性T细胞在用IgG1、rFVIII或rFVIIIIFc预处理的巨噬细胞或树突细胞的条件下培养基中培养之后调控性T细胞的百分比的图形表示。

[0185] 图7为所提出的rFVIIIIFc调控性T细胞分化机制的图解。

[0186] 图8为所提出的rFIXFc对巨噬细胞的作用的图解。

具体实施方式

[0187] 本公开提供诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用有效量的包含凝血因子和Fc区的嵌合蛋白或包含凝血因子和Fc区的组合物,其中所述人类已产生针对所述凝血因子的抑制剂并且未能响应于一种或多种针对所述凝血因子的先前免疫耐受性疗法。在一些实施方案中,所述凝血因子选自由以下组成的组:因子VII(FVII)、因子VIIa(FVIIa)、FVIII、FIX、因子X(FX)、冯·维勒布兰德因子(von Willebrand factor, VWF)及其任何组合。

[0188] I. 定义

[0189] 应注意,术语“一(个/种)”实体是指一个或多个(种)所述实体;例如,“一个核苷酸序列”应理解为表示一个或多个核苷酸序列。因此,术语“一个(种)”、“一个或多个(种)”和“至少一个(种)”在本文中可互换使用。

[0190] 此外,“和/或”在本文中使用时应视为对两个指定特征或组分中的每一者在存在或不存在另一者的情况下的具体公开内容。因此,如本文在诸如“A和/或B”的短语中使用的术语“和/或”意图包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)和“B”(单独)。同样,如诸如“A、B和/或C”

的短语中使用的术语“和/或”意图涵盖以下方面中的每一者：A、B和C；A、B或C；A或C；A或B；B或C；A和C；A和B；B和C；A(单独)；B(单独)；和C(单独)。

[0191] 应理解,当在本文中用语言“包含”描述各方面时,还提供以“由...组成”和/或“实质上由...组成”的术语描述的其他相似方面。

[0192] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有与本公开所属领域的一般技术人员通常所理解相同的含义。例如,the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第2版, 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第3版, 1999, Academic Press; 和 the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, 其向技术人员提供本公开所使用的许多术语的大体解释。

[0193] 单位、前缀和符号均以其国际单位制 (Système International de Unites, SI) 公认形式表示。数字范围包括限定所述范围的数字。除非另外指明, 否则氨基酸序列为自左至右以氨基至羧基取向书写。本文中提供的标题不限制本公开的各种方面, 所述方面可通过参考整个说明书得出。因此, 即将在下文定义的术语通过参照说明书全文进行更充分地定义。

[0194] 术语“约”在本文中用于意指近似、大致、大约或在...区域内。当术语“约”与数字范围结合使用时, 其通过使边界扩展高于和低于所陈述的数值来修饰该范围。因此, “约10-20”意指“约10至约20”。一般而言, 术语“约”可通过例如向上或向下(升高或降低)10百分比的变化修饰高于或低于所述值的数值。

[0195] 如本文所用的“施用”意指经由药学上可接受的途径向受试者给予本文所公开的例如包含嵌合蛋白的药学上可接受的组合物。施用途径可为静脉内, 例如静脉内注射和静脉内输注。其他施用途径包括例如皮下、肌肉内、经口、经鼻和肺部施用。嵌合蛋白和杂合蛋白可作为包含至少一种赋形剂的药物组合物的一部分施用。在一些实施方案中, 所述凝血因子和/或Fc(例如, 嵌合蛋白)为通过基因疗法向人类施用, 例如, 其中向人类施用一种或多种编码所述凝血因子和/或Fc(例如, 所述嵌合蛋白)的多核苷酸, 并且所述凝血因子和/或Fc(例如, 所述嵌合蛋白)在所述人类中表达。

[0196] 如本文所用的“治疗(Treat/treatment/treating)”是指例如减轻疾病或病状的严重性; 减少病状病程的持续时间; 改善或消除与疾病或病状相关联的一种或多种症状; 向患有疾病或病状的受试者提供有益效应, 未必治愈所述疾病或病状。在一些实施方案中, 术语“治疗”意指减少或消除对凝血因子(例如, FVIII)的抑制性免疫反应。

[0197] 如本文所用的术语“诱导免疫耐受性”意指在受试者中引发当施用特定刺激物(例如, 施用凝血因子(例如, FVIII))时受试者不具有免疫反应的状况。此状况(免疫耐受性)可为暂时的, 使得所述受试者对所述刺激物耐受一定时间, 或者为长时间的, 使得所述受试者无限期地对所述刺激物耐受。在某些实施方案中, 只要向所述受试者施用刺激物, 所述受试者便对所述刺激物保持耐受。例如, 在一些实施方案中, 只要以给定给药间隔向所述受试者施用包含所述凝血因子和Fc区的所述嵌合蛋白, 所述受试者便对所述凝血因子保持耐受。在其他实施方案中, 甚至在终止施用包含凝血因子和Fc区的嵌合蛋白之后, 所述受试者仍保持对所述凝血因子耐受。

[0198] 在一些实施方案中, 免疫反应为“抑制性”免疫反应。抑制性免疫反应为阻断或减

小刺激物的效应(例如,施用凝血因子(例如,FVIII))的免疫反应。在某些实施方案中,抑制性免疫反应包括产生针对刺激物的抑制性抗体,例如抑制性抗FVIII抗体。如本文所用的术语“抑制性抗体(inhibitory antibody/inhibitory antibodies)”是指阻断或减小抗体所识别的抗原的功能的抗体。例如,针对FVIII的抑制性抗体阻断或减小FVIII的活性。在一些实施方案中,抑制性抗体结合抗原(例如,FVIII)并加速抗原从人类血清中清除。当所述抗体加速所述抗原的清除时,所述抗体减少所述抗原的半衰期。

[0199] 抑制性免疫反应可使用实验室测试诸如贝塞斯达测试或贝塞斯达测试的奈梅根(Nijmegen)修改版本进行确定。至少0.6个贝塞斯达单位(BU)的水平可指示存在抑制性免疫反应。至少5BU的水平可指示存在高效价抑制剂。还可使用推注凝血因子输注的体内恢复率和半衰期的测量。在某些实施方案中,当人类的抑制性抗体的效价小于约5BU、小于约4BU、小于约3BU、小于约2BU、小于约1BU、小于约0.9BU、小于约0.8BU、小于约0.7BU、小于约0.6BU、小于约0.5BU、小于约0.4BU、小于约0.3BU、小于约0.2BU、小于约0.1BU或为约0BU时,观察到免疫耐受性。在一个特定实施方案中,当人类的抑制性抗体的效价小于约0.6BU时,观察到免疫耐受性。

[0200] 在其他实施方案中,免疫反应包括细胞介导的免疫反应。在一些实施方案中,所述细胞介导免疫反应包括细胞因子的释放。在某些实施方案中,作为细胞介导的免疫反应的一部分释放的细胞因子可选自由以下组成的组:IL-12、IL-4、IL-17、TNF- α 及其任何组合。

[0201] 在其他实施方案中,所述免疫反应包括选自由以下组成的组的临床症状:出血倾向增加、凝血因子消耗高、缺乏对凝血因子疗法的反应、凝血因子疗法的功效减小、凝血因子的半衰期缩短及其任何组合。

[0202] 在其他实施方案中,通过在向人类施用之后凝血因子的半衰期增加来测量免疫耐受性。在一些实施方案中,一旦与在免疫耐受性诱导之前向人类施用的凝血因子的半衰期相比,凝血因子的半衰期增加至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约75%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约300%、至少约400%、至少约500%或至少约1000%,便诱导免疫耐受性。在某些实施方案中,在免疫耐受性诱导之后,凝血因子的半衰期为至少约3小时、至少约4小时、至少约5小时、至少约6小时、至少约7小时、至少约8小时、至少约9小时、至少约10小时、至少约11小时、至少约12小时、至少约13小时、至少约14小时或至少约15小时。

[0203] 如本文所用的术语“相当”意指由例如使用嵌合蛋白引起的比较速率或水平等于、实质上等于或类似于参考速率或水平。如本文所用的术语“类似”意指比较速率或水平与参考速率或水平(例如,基本上由两个Fc部分和经加工FVIII组成的嵌合蛋白的FXa产生速率,其中经加工FVIII融合至两个Fc部分的一个Fc)相差不大于10%或不大于15%。术语“实质上相等”意指比较速率或水平与参考速率或水平相差不大于0.01%、0.5%或1%。

[0204] 如本文所用的止血障碍意指特征在于由于形成纤维蛋白凝块的能力受损或不能形成纤维蛋白凝块而有自发出血或因创伤而出血的倾向的基因遗传性或获得性病状。此类病症的实例包括血友病。三种主要形式为A型血友病(因子VIII缺乏症)、B型血友病(因子IX缺乏症或“克雷司马斯病(Christmas disease)”)和C型血友病(因子XI缺乏症,轻度出血倾向)。其他止血障碍包括例如冯·维勒布兰德;因子XI缺乏症(PTA缺乏症);因子XII缺乏症;纤维蛋白原、凝血酶原、因子V、因子VII、因子X或因子XIII缺乏症或结构异常;伯纳德-苏里

尔综合征 (Bernard-Soulier syndrome), 其为一种 GPIb 缺陷症或缺乏症。VWF 的受体 GPIb 可为有缺陷的并且导致缺乏初级凝块形成 (初级止血) 和流血倾向增加、以及格兰茨曼 (Glanzman) 和内格利 (Naegeli) 血小板无力症 (thrombasthenia) (格兰茨曼血小板无力症)。在肝衰竭 (急性和慢性形式) 中, 由肝产生的凝血因子存在不足; 这可增加流血风险。

[0205] 如本文所用的“血浆浓度-时间曲线下面积 (AUC)”为与药理学领域的术语相同, 并且是基于施用之后 FVIII 吸收的速率和程度。AUC 为在指定时间段内, 诸如 12、18、24、36、48 或 72 小时或无限时间基于曲线的斜率使用外推确定。除非本文另外指定, 否则无限地施用 AUC。AUC 的确定可在单一受试者中进行, 或在受试者群体中进行, 然后计算平均值。

[0206] 术语“促凝血活性”意指本发明的凝血因子 (例如, FVIII) 能够取代原生凝血因子 (例如, 原生 FVIII) 参与血液中的凝血级联。若干分析可用于测量因子 VIII 活性, 其包括一级凝血分析 (活化部分促凝血酶原激酶时间; aPTT)、凝血酶产生时间 (TGA) 和旋转血栓弹力仪 (ROTEM®)。

[0207] 对免疫球蛋白或免疫球蛋白片段或区域的氨基酸编号所进行的参考全部基于 Kabat 等 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 美国公共卫生部 (U.S. Department of Public Health), Bethesda, MD, 其以全文引用方式并入本文。(已从包括人类的若干哺乳动物物种分离出 FcRn 受体。已知人类 FcRn、大鼠 FcRn 和小鼠 FcRn 的序列 (Story 等, J. Exp. Med. 180:2377 (1994), 其以全文引用方式并入本文。) Fc 可包含免疫球蛋白中具有或不具有免疫球蛋白铰链区的 CH2 结构域和 CH3 结构域。WO 2004/101740 和 WO 2006/074199 中提供示例性 Fc 变体, 所述专利以全文引用方式并入本文。

[0208] 如本文所用的“杂合”多肽和蛋白意指嵌合蛋白与第二多肽的组合。杂合物中的嵌合蛋白与第二多肽可经由蛋白质-蛋白质相互作用 (诸如电荷-电荷或疏水性相互作用) 彼此缔合。杂合物中的嵌合蛋白和第二多肽可经由二硫键或其他共价键彼此缔合。杂合物描述于 WO 2004/101740 和 WO 2006/074199 中, 所述专利各自均以全文引用方式并入本文。还参见美国专利第 7,404,956 号和第 7,348,004 号, 所述专利各自均以全文引用方式并入本文。第二多肽可为相同嵌合蛋白的第二拷贝或其可为不相同的嵌合蛋白。

[0209] 如本文所用, 在蛋白质序列中“对应于...的氨基酸”、“对应于...的位点”或“等效氨基酸”通过比对以使第一蛋白质序列 (例如, FVIII 序列) 与第二蛋白质序列 (例如, 第二 FVIII 序列) 之间的同一性或相似性最大化来鉴别。用于鉴别第二蛋白质序列中的等效氨基酸的编号是基于用于鉴别第一蛋白质序列中的对应氨基酸的编号。

[0210] 如本文所用, 术语“插入位点”是指多肽 (通常为成熟多肽, 例如, 成熟 FVIII 多肽) 或其片段、变体或衍生物中紧靠可插入异源部分的位置的上游的氨基酸残基编号。以编号指定“插入位点”, 所述编号是指定蛋白质序列中由插入位点所对应的氨基酸的编号, 所述氨基酸紧靠插入位置的 N 末端。例如, 短语“FVIII 在对应于给定序列的氨基酸 745 的插入位点处包含异源部分”指示异源部分位于对应于所述序列的氨基酸 745 和氨基酸 746 的两个氨基酸之间。然而, 本领域技术人员将能够容易地识别所指示蛋白质的任何变体中的对应位置, 并且本公开不局限于仅在本文具体公开的变体中进行的插入。相反, 本文所公开的插入可在任何相关变体或其具有活性的片段中对应于本文所公开的变体位置的位置处进行。

[0211] 如本文所用的短语“紧靠氨基酸的下游”是指紧接于氨基酸的末端羧基的位置。类似地, 短语“紧靠氨基酸的上游”是指紧接于氨基酸的末端氨基的位置。因此, 如本文所用的

短语“在插入位点的两个氨基酸之间”是指异源部分(例如,半衰期延长部分)插入在两个相邻氨基酸之间所处的位置。

[0212] 如本文所用的术语“插入”、“被插入”、“插入至...中”或语法相关术语是指相对于在指定蛋白质(例如,FVIII蛋白)中相似位置,异源部分(例如,半衰期延长部分)在融合多肽中的位置。本领域技术人员应理解如何鉴别相对于其他多肽序列(例如,其他FVIII变体)的对应插入位置。如本文所用,所述术语是指本文所公开的重组多肽的特征,并且不指示、暗示或意指制备融合多肽的任何方法或过程。例如,对于本文所提供的融合多肽,短语“将异源部分插入紧邻FVIII多肽的残基745的下游”意指所述融合多肽在紧邻对应于特定FVIII变体中氨基酸745的氨基酸的下游包含异源部分,其例如由对应于FVIII变体的氨基酸745和746的氨基酸所限定。

[0213] “融合”或“嵌合”蛋白包括使第一氨基酸序列连接于在自然界中未天然连接的第二氨基酸序列。通常存在于单个蛋白质中的氨基酸序列可集合在一起形成融合多肽,或通常存在于同一蛋白质中的氨基酸序列可以新排列安置在融合多肽中,所述融合多肽例如为本发明的FVIII结构域与Ig Fc结构域的融合物。融合蛋白例如通过化学合成或通过产生并翻译以所需关系编码肽区域的多核苷酸来产生。融合蛋白可还包含通过共价非肽键或非共价键与第一氨基酸序列缔合的第二氨基酸序列。

[0214] 术语“异源”和“异源部分”意指多核苷酸、多肽或其他部分源于与其相比较的实体不同的实体。例如,异源多肽可为合成多肽或源于不同物种、个体的不同细胞类型或不同个体的相同或不同细胞类型。在一方面,异源部分为与另一多肽融合以产生融合多肽或蛋白质的多肽。在另一方面,异源部分为与多肽或蛋白质缀合的非多肽诸如PEG。

[0215] 如本文所用的术语“连接”和“融合”是指第一氨基酸序列或核苷酸序列分别共价或非共价接合至第二氨基酸序列或核苷酸序列。第一氨基酸或核苷酸序列可直接与第二氨基酸或核苷酸序列接合或并列,或者间插序列可将第一序列共价接合于第二序列。术语“连接”不仅意指第一氨基酸序列在C末端或N末端融合于第二氨基酸序列,而且还包括将整个第一氨基酸序列(或第二氨基酸序列)插入第二氨基酸序列(或相应地第一氨基酸序列)中的任何两个氨基酸中。在一个实施方案中,第一氨基酸序列通过肽键或接头连接至第二氨基酸序列。第一核苷酸序列可通过磷酸二酯键或接头连接于第二核苷酸序列。接头可为肽或多肽(用于多肽链)或者核苷酸或核苷酸链(用于核苷酸链)或任何化学部分(用于多肽与多核苷酸链两者)。术语“连接”也由连字符(-)指示。

[0216] 如本文所用,术语“与...缔合”是指第一条氨基酸链与第二条氨基酸链之间形成的共价键或非共价键。在一个实施方案中,术语“与...缔合”意指共价非肽键或非共价键。此缔合可由冒号,即(:)指示。在另一个实施方案中,所述缔合意指除肽键之外的共价键。例如,氨基酸半胱氨酸包含可与第二半胱氨酸残基上的硫醇基形成二硫键或二硫桥的硫醇基。在大多数天然存在的IgG分子中,CH1区与CL区通过二硫键缔合并且两个重链通过两个二硫键在对应于239和242的位置处缔合,所述位置为使用Kabat编号系统(位置226或229,EU编号系统)。共价键的实例包括但不限于肽键、金属键、氢键、二硫键、 ζ 键、 π 键、 δ 键、糖苷键、抓氢键(agnostic bond)、弯曲键、偶极键、 π 反向键、双键、三键、四键、五键、六键、共轭、超共轭、芳香性、哈普托数(hapticity)或反键结。非共价键的非限制性实例包括离子键(例如阳离子 π 键或盐键)、金属键、氢键(例如二氢键、二氢复合物、低障壁氢键或对称氢键)、范德华力

(van der Waals force)、伦敦分散力(London dispersion force)、机械键(mechanical bond)、卤素键、亲金作用(aurophilicity)、嵌入、堆积作用、熵力(entropic force)或化学极性。

[0217] 如本文所用,术语“裂解位点”或“酶促裂解位点”是指由酶识别的位点。某些酶促裂解位点包括细胞内加工位点。在一个实施方案中,多肽具有由在凝血级联期间活化的酶裂解的酶促裂解位点,因此此类位点的裂解发生在凝块形成的部位处。示例性此类位点包括例如由凝血酶、因子XIa或因因子Xa识别的那些位点。其他酶促裂解位点在本领域中为已知的。

[0218] 如本文所用,术语“加工位点”或“细胞内加工位点”是指多肽中一种类型的酶促裂解位点,其为在所述多肽翻译之后起作用的酶的靶标。在一个实施方案中,此类酶在从高尔基体腔(Golgi lumen)转运至高尔基体外侧(trans-Golgi)区室期间起作用。细胞内加工酶在蛋白质自细胞分泌之前裂解多肽。此类加工位点的实例包括例如由内肽酶的PACE/弗林蛋白酶(furin)(其中PACE为成对碱性氨基酸裂解酶(Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme)的首字母缩略词)家族所靶向的那些位点。这些酶定位于高尔基体膜并且在序列基序Arg-[任何残基]- (Lys或Arg)-Arg的羧基端侧上裂解蛋白质。如本文所用,“弗林蛋白酶”酶家族包括例如PCSK1(也称为PC1/PC3)、PCSK2(也称为PC2)、PCSK3(也称为弗林蛋白酶或PACE)、PCSK4(也称为PC4)、PCSK5(也称为PC5或PC6)、PCSK6(也称为PACE4)、或PCSK7(也称为PC7/LPC、PC8或SPC7)。其他加工位点为本领域中已知的。

[0219] 在包含多于一个加工或裂解位点的构建体中,应了解此类位点可相同或不同。

[0220] 如本文所用,“可加工接头”是指包含至少一个在本文其他地方描述的细胞内加工位点的接头。

[0221] 如本文所用的“基线”为在施用剂量之前受试者中给定分析物(例如,凝血因子(例如,FVIII)或抗体(例如,抗FVIII抗体))的最低测量血浆水平。血浆水平可在给药之前的两个时间点测量:在筛选随访时和即将给药之前。

[0222] 如本文所用的“等效剂量”意指与以国际单位表述相同的凝血因子活性(例如,FVIII活性)的剂量,其与所述多肽的分子量无关。例如,一个国际单位(IU)的FVIII活性近似对应于一毫升正常人类血浆中FVIII的量。若干分析可用于测量凝血因子活性,包括欧洲药典显色底物分析和一级凝血分析。

[0223] 如本文所用的“给药间隔”意指向受试者施用的多次剂量之间逝去的时间量。给药间隔的比较可在单一受试者中进行,或在受试者群体中进行,然后可计算群体中所获得的平均值。

[0224] 如本文所用的“受试者”意指人类个体。受试者可为当前正罹患出血病症或预期有此治疗需要的患者。在一些实施方案中,受试者先前从未用凝血因子进行治疗(即,所述受试者为先前未治疗受试者或先前未治疗患者)。在一些实施方案中,受试者为胎儿,并且所述方法包括向胎儿的母亲施用所述组合物或所述嵌合蛋白,并且向受试者施用为从母体跨过胎盘而发生。在一些实施方案中,受试者为儿童或成人。在一些实施方案中,受试者为小于一岁、小于两岁、小于三岁、小于四岁、小于五岁、小于六岁、小于七岁、小于八岁、小于九岁、小于十岁、小于十一岁或小于十二岁的儿童。在一些实施方案中,儿童小于一岁。在一些实施方案中,儿童或成人受试者产生出血病症,其中出血病症的症状的发作是在一岁之后。

在一些实施方案中,向受试者施用组合物或嵌合蛋白足以预防、抑制或减小选自以下的免疫反应的产生:针对凝血因子的体液免疫反应、细胞介导的免疫反应或体液免疫反应和细胞介导的免疫反应两者。在一些实施方案中,受试者为人类,并且受试者先前已产生对凝血因子的免疫反应。在一些实施方案中,人类先前无法响应于免疫耐受性疗法。在一些实施方案中,先前免疫耐受性疗法包括施用高剂量凝血因子。在其他实施方案中,先前免疫耐受性疗法包括施用一种或多种免疫抑制剂。在一个实施方案中,先前免疫耐受性疗法为Malmo方案。在另一个实施方案中,先前免疫耐受性疗法为Bonn方案。

[0225] 如本文所用(可互换)的“治疗剂量”、“剂量”、“有效剂量”或“给药量”意指实现如本文所述的治疗目标的剂量。在一些实施方案中,“治疗剂量”意指诱导受试者的免疫耐受性的剂量。在某些实施方案中,“治疗剂量”意指在指定耐受时间期间内(例如,在施用第一剂量的12周内)诱导受试者的免疫耐受性的剂量。

[0226] 本发明中还包括多肽的片段或变体及其任何组合。术语“片段”或“变体”当指代本公开的方法中所用的多肽时包括保留参考多肽的至少一些特性(例如,对于FcRn结合结构域或Fc变体的FcRn结合亲和力或对于FVIII的凝血活性)的任何多肽。除在本文中其他地方讨论的特异性抗体片段之外,多肽的片段还包括蛋白水解片段以及缺失片段,但不包括天然存在的全长多肽(或成熟多肽)。本公开的方法中所用的多肽结合结构域或结合分子的变体包括如上所述的片段,并且还包含氨基酸序列由于氨基酸取代、缺失或插入而改变的多肽。变体可为天然存在的或非天然存在的。非天然存在的变体可使用本领域已知的诱变技术来产生。变异多肽可包含保守性或非保守性氨基酸取代、缺失或添加。

[0227] “保守性氨基酸取代”为氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基置换的取代。具有类似侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中加以定义,包括碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,如果多肽中的氨基酸被来自同一侧链家族的另一氨基酸置换,则该取代将视为保守的。在另一个实施方案中,一连串氨基酸可被侧链家族成员的顺序和/或组成不同的结构上类似的氨基酸串保守地置换。

[0228] 两个多核苷酸或多肽序列之间使用的术语“序列同一性百分比”是指在比较窗口上由所述序列共享的一致匹配位置数,其考虑到为了进行两个序列的最佳比对必须引入的添加或缺失(即,间隙)。匹配位置为靶序列和参考序列二者中存在相同核苷酸或氨基酸的任何位置。靶序列中存在的间隙不做计数,因为间隙不是核苷酸或氨基酸。同样,参考序列中存在的间隙不做计数,因为对靶序列核苷酸或氨基酸计数,而不对来自参考序列的核苷酸或氨基酸计数。

[0229] 通过以下方式来计算序列同一性百分比:测定两个序列中存在相同氨基酸残基或核酸碱基的位置的数目以产生匹配位置的数目,用匹配位置的数目除以比较窗中位置的总数并且将结果乘以100以产生序列同一性百分比。两个序列之间的序列比较和序列同一性百分比的测定可使用供在线使用与下载两者的可易于得到的软件完成。适合软件程序可从各种来源获得,并且可用于比对蛋白质和核苷酸序列。一种适于测定序列同一性百分比的

程序为bl2seq,其为可从美国政府的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)BLAST网站(blast.ncbi.nlm.nih.gov)获得的BLAST程序套件的一部分。Bl2seq使用BLASTN或BLASTP算法进行两个序列之间的比较。BLASTN用于比较核酸序列,而BLASTP用于比较氨基酸序列。其他适合程序为例如Needle、Stretcher、Water或Matcher,其为生物信息程序的EMBOSS套件的部分,并且也可获自欧洲生物信息研究所(EBI)的www.ebi.ac.uk/Tools/psa。

[0230] 与多核苷酸或多肽参考序列比对的单个多核苷酸或多肽靶序列内的不同区可各自具有其自身的序列同一性百分比。应注意,将序列同一性百分比值舍入至最接近的十分位。例如,将80.11、80.12、80.13和80.14向下舍入至80.1,而将80.15、80.16、80.17、80.18和80.19向上舍入至80.2。还应注意,长度值将始终为整数。

[0231] 本领域技术人员将理解,产生用于计算序列同一性百分比的序列比对不限于唯一地由原始序列数据驱动的二进制序列-序列比较。序列比对可来源于多重序列比对。一种产生多序列比对的适合程序为ClustalW2,可获自www.clustal.org。另一适合程序为MUSCLE,可获自www.drive5.com/muscle/。ClustalW2和MUSCLE可替代地可获自例如EBI。

[0232] 还应理解,序列比对可通过将序列数据与异质来源的数据的整合产生,所述异质来源的数据诸如结构数据(例如,结晶蛋白结构)、功能数据(例如,突变位置)或谱系学数据。整合异类数据以产生多序列比对的适合程序为T-Coffee,其获自www.tcoffee.org并且可替代地获自例如EBI。还应了解用于计算序列同一性百分比的最终比对可自动或手动策划。

[0233] 多核苷酸变体可在编码区、非编码区或两者中含有改变。在一个实施方案中,多核苷酸变体含有产生沉默取代、添加或缺失,但不改变所编码多肽的性质或活性的改变。在另一个实施方案中,核苷酸变体由于遗传密码的简并性而由沉默取代产生。在其他实施方案中,以任何组合取代、缺失或添加5-10、1-5、或1-2个氨基酸的变体。多核苷酸变体可出于多种原因,例如为了优化特定宿主的密码子表达(使人类mRNA中的密码子变成例如细菌宿主诸如大肠杆菌(E.coli)的其他密码子)而产生。

[0234] 天然存在的变体称为“等位基因变体”并且是指占据生物体的染色体上给定基因座的若干基因替代形式之一(Genes II,Lewin,B.编,John Wiley&Sons,New York(1985))。这些等位基因变体可在多核苷酸和/或多肽层面上变化并且包括在本公开中。或者,非天然存在的变体可通过诱变技术或通过直接合成来产生。

[0235] 使用蛋白质工程改造和重组DNA技术的已知方法,可产生变体以改善或改变多肽的特征。例如,可从分泌蛋白质的N末端或C末端缺失一个或多个氨基酸而不实质性损失生物功能。Ron等,J.Biol.Chem.268:2984-2988(1993)(以全文引用方式并入本文)报导甚至在缺失3、8或27个氨基端氨基酸残基之后仍具有肝素结合活性的变异KGF蛋白。类似地,在干扰素 γ 的羧基末端缺失8-10个氨基酸残基之后,此蛋白质展现出活性增高多达十倍。(Dobeli等,J.Biotechnology 7:199-216(1988),其以全文引用方式并入本文。)

[0236] 此外,充足证据显示变体通常保留与天然存在的蛋白质的生物活性类似的生物活性。例如,Gayle和同事(J.Biol.Chem.268:22105-22111(1993),其以全文引用方式并入本文)对人类细胞因子IL-1 α 进行了广泛的突变分析。他们使用随机诱变来产生超过3,500种个别IL-1 α 突变体,每个变体在分子总长度上具有平均2.5个氨基酸变化。检查每个可能氨

氨基酸位置处的多个突变。研究者发现“[大多数]分子可在对[结合或生物活性]的影响极小下进行改变”。(参见摘要。)实际上,在检查的多于3,500个核苷酸序列中,仅23个独特氨基酸序列产生活性显著不同于野生型的蛋白质。

[0237] 如上文所述,多肽变体包括例如修饰的多肽。修饰包括例如乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、共价连接黄素、共价连接原血红素(heme)部分、共价连接核苷酸或核苷酸衍生物、共价连接脂质或脂质衍生物、共价连接磷脂酰肌醇、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、形成共价交联、形成半胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、 γ -羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、聚乙二醇化(Mei等,Blood 116:270-79(2010),其以全文引用的方式并入本文中)、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、转移-RNA介导的向蛋白质添加氨基酸(诸如精胺酰化)以及泛素化。在一些实施方案中,在任何方便的位置处对FVIII进行修饰,例如聚乙二醇化。在一些实施方案中,在FVIII的表面暴露的氨基酸(例如表面暴露的半胱氨酸)处将FVIII聚乙二醇化,所述氨基酸可为工程改造的半胱氨酸。同上。在一些实施方案中,修饰的FVIII(例如,聚乙二醇化FVIII)为嵌合或融合FVIII。

[0238] 术语“下游”是指位于参考核苷酸序列的3'方向的核苷酸序列。“下游”也可以是指位于参考肽序列的C末端的肽序列。

[0239] 术语“上游”是指位于参考核苷酸序列的5'方向的核苷酸序列。“上游”也可以是指位于参考肽序列的N末端的肽序列。

[0240] 如本文所用,术语“调控区”是指位于编码区的上游(5'非编码序列)、内部或下游(3'非编码序列)并且影响所缔合编码区的转录、RNA加工、稳定性或翻译的核苷酸序列。调控区可包含启动子、翻译前导序列、内含子、聚腺苷酸化识别序列、RNA加工位点、效应物结合位点和茎-环结构。如果编码区意图用于在真核细胞中表达,则聚腺苷酸化信号和转录终止序列通常将位于编码序列的3'方向。

[0241] 编码基因产物(例如,多肽)的多核苷酸可包含与一个或多个编码区可操作地缔合的启动子和/或其他转录或翻译控制元件。除启动子之外的其他转录控制元件,例如增强子、操纵子、阻遏子和转录终止信号,也可与编码区可操作地缔合以引导基因产物表达。

[0242] 本领域技术人员已知多个转录控制区。所述转录控制区包括但不限于在脊椎动物细胞中起作用的转录控制区,诸如但不限于来自巨细胞病毒(立即早期启动子与内含子A的组合)、猴病毒40(早期启动子)和逆转录病毒(诸如劳斯肉瘤病毒)的启动子和增强子区段。其他转录控制区包括源于脊椎动物基因,诸如肌动蛋白(actin)、热休克蛋白、牛生长激素和兔 β -球蛋白的那些控制区,以及能够控制真核细胞中的基因表达的其他序列。其他适合的转录控制区包括组织特异性启动子和增强子,以及淋巴因子诱导性启动子(例如,可由干扰素或白介素诱导的启动子)。

[0243] 类似地,本领域普通技术人员已知多种翻译控制元件。所述元件包括但不限于,核糖体结合位点、翻译起始和终止密码子,以及源自于细小核糖核酸病毒的元件(特别是内部核糖体进入位点或IRES,又称为CITE序列)。

[0244] 如本文所用,术语“表达”是指多核苷酸藉以产生基因产物(例如RNA或多肽)的过程。

[0245] “载体”是指用于将核酸克隆和/或转移至宿主细胞中的任何媒介物。载体可为可

与另一核酸区段连接以使所连接区段复制的复制子。“复制子”是指在体内充当自主复制单元,即能够在自身控制下复制的任何遗传元件(例如质粒、噬菌体、粘粒、染色体、病毒)。术语“载体”包括用于在体外、离体或体内将核酸引入细胞中的病毒和非病毒媒介物。本领域中已知并使用许多载体,包括例如质粒、修饰的真核病毒或修饰的细菌病毒。将多核苷酸插入适合载体中可通过将适当多核苷酸片段连接至具有互补粘性末端的所选载体中来实现。

[0246] 术语“质粒”是指染色体外元件,其常携带不为细胞的重要代谢的部分的基因,并且通常呈环状双链DNA分子形式。此类元件可为源于任何来源的单链或双链DNA或RNA的线性、环状或超螺旋自主复制序列、基因组整合序列、噬菌体或核苷酸序列,其中许多核苷酸序列已接合或重组成能够将启动子片段和所选基因产物的DNA序列连同适当3'未翻译序列一起引入细胞中的独特构造。

[0247] 可使用的真核病毒载体包括但不限于腺病毒载体、逆转录病毒载体、腺相关病毒载体和痘病毒(例如牛痘病毒)载体、杆状病毒载体或疱疹病毒载体。非病毒载体包括质粒、脂质体、带电荷脂质(细胞转染剂)、DNA-蛋白质复合物和生物聚合物。

[0248] “克隆载体”是指一种“复制子”,其为依序复制并包含复制起点的单位长度的核酸(诸如质粒、噬菌体或粘粒),另一核酸区段可与其连接以实现所连接区段的复制。某些克隆载体能够在一种细胞类型(例如细菌)中复制并且在另一细胞类型(例如真核细胞)中表达。克隆载体通常包含一种或多种可用于选择包含载体的细胞的序列和/或一个或多个用于插入相关核酸序列的多克隆位点。

[0249] 术语“表达载体”是指设计成使插入的核酸序列能够在插入宿主细胞中之后表达的媒介物。插入的核酸序列以与如上所述的调控区可操作缔合的方式设置。

[0250] 通过本领域中熟知的方法将载体引入宿主细胞中,所述方法例如转染、电穿孔、显微注射、转导、细胞融合、DEAE葡聚糖、磷酸钙沉淀、脂质体转染(溶酶体融合)、使用基因枪、或DNA载体转运体。

[0251] “分离的”多肽或其片段、变体或衍生物是指不在天然环境中的多肽。不要求特定纯化水平。例如,分离的多肽可仅从其原生或天然环境移除。出于本发明的目的,在宿主细胞中表达的重组产生的多肽和蛋白质被认为是分离的,已通过任何适合技术分离、分馏或部分地或实质上纯化的天然或重组多肽也被认为是分离的。

[0252] 如本文所用,术语“宿主细胞”是指带有或能够带有重组核酸的细胞或细胞群体。宿主细胞可为原核细胞(例如,大肠杆菌),或者可替代地,宿主细胞可为真核细胞,例如真菌细胞(例如,酵母细胞,诸如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)或粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)),以及各种动物细胞,诸如昆虫细胞(例如,Sf-9)或哺乳动物细胞(例如,HEK293F、CHO、COS-7、NIH-3T3)。

[0253] 如本文所用的“稳定状态分布体积(V_{ss})”具有与药理学中所用的术语相同的含义,其为药物分布于其中的外观空间(体积)。 V_{ss} = 稳定状态时体内药物的量除以血浆浓度。

[0254] II. 本发明的方法

[0255] 本公开基于融合至Fc区的凝血因子可用于诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的发现,其中所述人类已产生针对凝血因子的抑制剂并且尚未通过一种或多种先前免疫耐受性疗法。尽管先前相信,用FVIII-Fc嵌合蛋白进行治疗可预防对FVIII治疗的免疫反应,

但是本公开中意外地发现,用凝血因子-Fc嵌合蛋白进行治疗可减少尚未响应于先前免疫耐受性疗法的人类的先前产生的免疫反应。因此,本公开提供用于诱导人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用有效量的包含凝血因子和Fc的组合物或包含凝血因子和Fc区的嵌合蛋白或编码它们的多核苷酸。

[0256] 本公开的另一方面涉及一种诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括(1)向所述人类施用有效量的包含凝血因子和Fc的组合物或包含凝血因子和Fc区的嵌合蛋白,其中所述有效量的所述组合物或嵌合蛋白诱导所述人类的免疫耐受性;以及(2)在诱导免疫耐受性之后,向所述人类施用所述组合物或嵌合蛋白的减量方案。在某些实施方案中,当人类的抑制性抗体的效价小于约0.6BU时发生免疫耐受性的诱导。在某些实施方案中,当人类的抑制性抗体的效价小于约0.6BU时发生免疫耐受性的诱导,并且如在血浆中所监测,凝血因子活性的恢复率为60%。在本公开的一些实施方案中,所述方法还包括(3)在所述减量方案之后,向所述人类施用预防剂量的所述凝血因子。在某些方面中,所述人类尚未用针对所述凝血因子的先前免疫耐受性疗法治疗。可在已确定人类已产生抑制剂免疫反应的任何时间向人类施用包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白,例如,在测量人类的抑制性免疫反应的水平之后。在其他实施方案中,可向尚未产生一个或多个抑制剂免疫反应的人类施用所述组合物或所述嵌合蛋白以预防抑制剂免疫反应的产生。在一些实施方案中,向产生抑制剂免疫反应的可能性高(例如,家族病史、遗传倾向或生物标记物的显示)的人类施用所述组合物或所述嵌合蛋白。在一些实施方案中,所述方法还包括在施用之前测量抑制性免疫反应的水平或产生抑制剂免疫反应的可能性。在一些实施方案中,在已确定人类已产生抑制剂免疫反应或人类有可能产生抑制剂免疫反应之后,例如在测量人类的抑制性免疫反应的水平或产生抑制剂免疫反应的可能性之后,小于约1日、小于约2日、小于约3日、小于约4日、小于约5日、小于约6日、小于约7日、小于约2周、小于约3周、小于约4周、小于约2个月、小于约3个月、小于约4个月、小于约5个月、小于约6个月、小于约1年、小于约2年、小于约3年、小于约4年或小于约5年向所述人类施用包含凝血因子和Fc区的所述组合物或所述嵌合蛋白。在某些实施方案中,在已确定人类已产生抑制剂免疫反应或人类有可能产生抑制剂免疫反应之后,例如在测量人类的抑制性免疫反应的水平或产生抑制剂免疫反应的可能性之后,立即向所述人类施用包含凝血因子和Fc区的所述组合物或所述嵌合蛋白。在特定实施方案中,在已确定人类已产生抑制剂免疫反应或人类有可能产生抑制剂免疫反应之后,例如在测量人类的抑制性免疫反应的水平或产生抑制剂免疫反应的可能性之后,小于约5分钟、小于约10分钟、小于约15分钟、小于约20分钟、小于约30分钟、小于约45分钟、小于约1小时、小于约2小时、小于约3小时、小于约4小时、小于约5小时、小于约6小时、小于约7小时、小于约8小时、小于约9小时、小于约10小时、小于约11小时、小于约12小时、约18小时或小于约24小时向所述人类施用包含凝血因子和Fc区的所述组合物或所述嵌合蛋白。在特定实施方案中,在已确定人类已产生抑制剂免疫反应或人类有可能产生抑制剂免疫反应之后,例如在测量人类的抑制性免疫反应的水平或产生抑制剂免疫反应的可能性之后,约5分钟、约10分钟、约15分钟、约20分钟、约30分钟、约45分钟、约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约18小时或约24小时向所述人类施用包含凝血因子和Fc区的所述组合物或所述嵌合蛋白。在某些实施方案中,在已确定人类已产生抑制剂免疫反应或人类有可能产生抑制剂免疫反应之

后,例如在测量人类的抑制性免疫反应的水平或产生抑制剂免疫反应的可能性之后,小于约1日向所述人类施用包含凝血因子和Fc区的所述组合物或所述嵌合蛋白。

[0257] 可继续诱导免疫反应,直至抑制剂的水平低于某一水平,或直至抑制剂不可检测。在某些实施方案中,诱导期可延续至少约24周、至少约26周、至少约28周、至少约30周、至少约32周、至少约34周、至少约36周、至少约38周、至少约40周、至少约42周、至少约44周、至少约46周、至少约48周、至少约50周、至少约52周、至少约54周、至少约56周、至少约58周、至少约60周、至少约62周、至少约64周、至少约66周、至少约68周、至少约70周。在一个特定实施方案中,诱导期小于60周。

[0258] 通过本发明的方法治疗的抑制性免疫反应可包括人体内负面影响凝血因子治疗的一种或多种效应的任何反应。在一些实施方案中,抑制性免疫反应包括产生针对凝血因子的抑制性抗体,例如抑制性抗FVIII抗体。在某些实施方案中,本公开的方法还包括在施用有效量的包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白或编码它们的多核苷酸之前(例如,基线时)和之后测量人类的一种或多种抑制性抗体的效价。在一些实施方案中,所述抑制性抗体的效价在施用之前(例如,基线时)为至少约0.6个贝塞斯达单位(BU)。在某些实施方案中,所述抑制性抗体的效价在所述施用之前(例如,基线时)为至少约1BU、至少约2BU、至少约3BU、至少约4BU、至少约5BU、至少约6BU、至少约7BU、至少约10BU、至少约20BU、至少约30BU、至少约40BU、至少约50BU、至少约100BU、至少约150BU或至少约200BU。在一个特定实施方案中,所述抑制性抗体的效价在施用之前(例如,基线时)为至少约5BU。

[0259] 在一些实施方案中,相对于施用之前抑制性抗体的效价,本发明的方法减小人类受试者的抑制性抗体的效价。在某些实施方案中,所述抑制性抗体的效价在施用之后为小于约0.6BU。在一些实施方案中,所述抑制性抗体的效价在施用之后为小于约0.5BU、小于约0.4BU、小于约0.3BU、小于约0.2BU或小于约0.1BU。在一个特定实施方案中,所述抑制性抗体的效价在施用之后为0BU。在其他实施方案中,所述抑制性抗体的效价在施用之后为小于5BU、小于4BU、小于3BU、小于2BU、小于1BU、小于0.9BU、小于0.8BU、小于0.7BU或小于0.6BU。

[0260] 在一些实施方案中,与未治疗的对照和单独用凝血因子治疗的人类中的巨噬细胞分化相比,所述施用增加人类中的巨噬细胞朝向M2样表型的分化。在一些实施方案中,M2样表型包括NRF2途径、PPAR γ 途径或NRF2途径和PPAR γ 途径两者的上调。在某些实施方案中,M2样表型包含CD206(MRC1)的上调。在某些实施方案中,M2样表型包含ARG1的上调。在某些实施方案中,M2样表型包含CD206(MRC1)和ARG1的上调。

[0261] 在一些实施方案中,相对于未治疗的受试者或单独用凝血因子治疗的受试者中一个或多个基因的表达,所述施用导致人类中一个或多个基因的表达更大。在某些实施方案中,所述施用导致选自以下组成的组的一个或多个基因的表达较大:Hmox1、PPAR γ 、LPL、EGR2、SLC04A1、血红素氧化酶1(HO-1)、氧化压力诱导的生长抑制剂1(OSGIN1)、超氧化物歧化酶1(SOD1)、二硫化谷胱甘肽还原酶(GSR)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化次单元(GCLC)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶修饰次单元(GCLM)、NAD(P)H醌去氢酶1(NQO1)、脂肪酸结合蛋白5(FABP5)、B7-H3(CD276)、SLAM家族成员3(SLAMF3;淋巴细胞抗原9;LY9)、SLAM家族成员7(SLAMF7)、甘露糖受体C型1(MRC1)、溶质载体家族12成员4(SLC12A)、神经纤毛蛋白1(NRP1)及其任何组合。在某些实施方案中,所述施用导致NRF2途径的一个或多个基因的表达较大。在某些实施方案中,所述NRF2途径的所述一个或多个基因选自以下组成的组:HO-1、

OSGIN1、SOD1、GSR、GCLC、GCLM、NQO1及其任何组合。在一些实施方案中,所述施用导致PPAR γ 途径的一个或多个基因的表达较大。在一些实施方案中,所述PPAR γ 途径的所述一个或多个基因选自由以下组成的组:PPAR γ 、LPL、FABP5、EGR2及其任何组合。在一些实施方案中,所述施用导致选自由以下组成的组的一个或多个基因的表达较大:B7-H3 (CD276)、SLAMF3、SLAMF7、MRC1、SLC12A、NRP1及其任何组合。在特定实施方案中,相对于未治疗的人类或单独施用凝血因子的人类中所述一个或多个基因的表达,所述施用导致所述一个或多个基因的表达更大,其中所述表达大至少约1.5倍、大至少约2倍、大至少约2.5倍、大至少约3倍、大至少约3.5倍、大至少约4倍、大至少约4.5倍或大至少约5倍。

[0262] 在一些实施方案中,在施用之后小于6小时观察到所述一个或多个基因的差异性表达。在一些实施方案中,在施用之后小于12小时观察到差异性表达。在一些实施方案中,在施用之后小于18小时观察到差异性表达。在一些实施方案中,在施用之后小于24小时观察到差异性表达。

[0263] 在一些实施方案中,抑制性免疫反应包括细胞介导的免疫反应。在某些实施方案中,所述细胞介导的免疫反应包括细胞因子的释放。在一些实施方案中,细胞因子为与免疫反应增加相关联的任何细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子选自由以下组成的组:IL-1、IL-6、IL-16、IL-12、IL-4、IL-17、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 α 、干扰素 γ 及其任何组合。在一个实施方案中,细胞介导的免疫反应包括IL-12的血清水平增加。在另一个实施方案中,细胞介导的免疫反应包括IL-4的血清水平增加。在另一个实施方案中,细胞介导的免疫反应包括IL-17的血清水平增加。在另一个实施方案中,细胞介导的免疫反应包括TNF- α 的血清水平增加。

[0264] 已将各种基因突变与产生抑制性免疫反应的风险增加联系起来。例如,已将Hap2内的TNF- α -308G>A多态性(其与TNF的组成性和诱导性转录水平增加相关联)与产生抑制性免疫反应的风险增加联系起来。参见Astermark等,Blood 108:3739-3745 (2006),其以全文引用方式并入本文。因此,在一些实施方案中,人类具有与TNF- α 增加相关联的遗传多态性。在一些实施方案中,多态性为TNF- α -308G>A多态性。在一些实施方案中,人类具有在IL10基因中的多态性,例如与IL10的分泌增加相关联的多态性。在一些实施方案中,向在IL10基因的启动子区中具有IL10G微卫星的等位基因134的受试者施用FVIII-Fc。参见Astermark等Hemostasis,Thrombosis,and Vascular Biology 108:3739-3745 (2006),其以全文引用方式并入本文。

[0265] 在一些实施方案中,所述人类具有与CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞抗原4)表达下降相关联的遗传多态性。在一些实施方案中,所述人类具有在DR15 (HLA-DR15)或DQB0602MHC(主要组织相容性复合物)II类分子中的突变。与患有血友病的受试者中抑制性免疫反应的产生相关联的其他MHC II类分子为A3、B7、C7、DQA0102、C2、DQA0103、DQB0603和DR13(参见Inhibitors in Patients with Hemophilia,E.C.Rodriguez-Merchan&C.A.Lee,编,Blackwell Science,Ltd.,2002)。

[0266] 在一些实施方案中,与利用由FVIII多肽组成的多肽进行先前治疗之后受试者的一种或多种细胞因子的水平相比,本公开的方法减小受试者的所述一种或多种细胞因子的水平。在另一个实施方案中,与施用之前受试者的一种或多种细胞因子的水平相比,本公开的方法减小受试者的所述一种或多种细胞因子的水平。在其他实施方案中,相对于施用之

前一种或多种致耐受性分子的表达水平,所述一种或多种致耐受性分子的表达在本公开的方法的施用之后有所增加。在某些实施方案中,所述一种或多种致耐受性分子选自IL-10、TGF- β 、IL-35、IDO-1及其任何组合。

[0267] 在其他实施方案中,所述免疫反应包括选自由以下组成的组的临床症状:出血倾向增加、凝血因子消耗高、缺乏对凝血因子疗法的反应、凝血因子疗法的功效减小、凝血因子的半衰期缩短及其任何组合。在某些实施方案中,免疫反应包括选自由以下组成的组的临床症状:出血倾向增加、凝血因子消耗高、缺乏对凝血因子疗法的反应、凝血因子疗法的功效减小、如在血浆中监测的凝血因子活性的恢复率减小、凝血因子的半衰期缩短及其任何组合。

[0268] 在某些实施方案中,人类先前诊断为患有抑制性免疫反应。此诊断可使用本领域中已知的任何方法进行。例如,如果人类具有以下一者或多者,则所述人类可表征为具有对凝血因子(例如,FVIII)的免疫反应:(a)抑制性抗体对凝血因子的效价大于或等于0.6BU;(b)选自由IL-12、IL-4、IL-17和TNF- α 组成的组的一种或多种细胞因子的血清水平增加;(c)出血倾向增加;(d)凝血因子消耗高;(e)缺乏对凝血因子疗法的反应;(f)凝血因子疗法的功效减小;(g)凝血因子的半衰期缩短及其任何组合。在一个特定实施方案中,如果人类具有大于或等于0.6BU的抑制性抗体对凝血因子的效价,则所述人类表征为具有对凝血因子的免疫反应。

[0269] 在一些实施方案中,人类先前诊断为在施用之前至少约1个月、至少约2个月、至少约3个月、至少约4个月、至少约5个月、至少约6个月、至少约7个月、至少约8个月、至少约9个月、至少约10个月、至少约11个月、至少约12个月、至少约13个月、至少约14个月、至少约15个月、至少约16个月、至少约17个月、至少约18个月、至少约19个月、至少约20个月、至少约21个月、至少约22个月、至少约23个月、至少约24个月、至少约27个月、至少约30个月、至少约33个月、至少约36个月、至少约39个月、至少约42个月、至少约45个月、至少约48年、至少约51个月、至少约54个月、至少约57个月、至少约60个月、至少约6年、至少约7年、至少约8年、至少约10年、至少约15年或至少约20年已产生对凝血因子的抑制性免疫反应。在一个实施方案中,所述人类先前被诊断为在所述施用之前至少约5年已产生对所述凝血因子的抑制性免疫反应。

[0270] 在一些实施方案中,与诱导免疫耐受性的护理标准方法相比,本公开的方法提供改善的耐受性时间。如本文所用的术语“耐受性时间”是指施用第一剂量的包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白与产生人类的免疫耐受性之间的时间量。减少耐受性时间可对人类相当有益,包括但不限于减少实现耐受性所需的总经济负担。在一些实施方案中,耐受性时间为约1至约24周、约1至约23周、约1至约22周、约1至约21周、约2至约20周、约2至约19周、约2至约18周、约2至约17周、约3至约16周、约3至约15周、约3至约14周、约3至约13周、约4至约12周、约4至约11周、约4至约10周、约4至约9周、约5至约8周、约5至约7周、约5至约6周、约1至约12周、约1至约11周、约1至约10周、约1至约9周、约1至约8周、约1至约7周、约1至约6周、约1至约5周或约1至约4周。在一些实施方案中,耐受性时间为小于约70周、小于约65周、小于约60周、小于约58周、小于约56周、小于约54周、小于约52周、小于约50周、小于约48周、小于约46周、小于约44周、小于约42周、小于约40周、小于约38周、小于约36周、小于约34周、小于约32周、小于约30周、小于约28周、小于约26周、小于约24周、小于约23周、小于约22

周、小于约21周、小于约20周、小于约19周、小于约18周、小于约17周、小于约16周、小于约15周、小于约14周、小于约13周、小于约12周、小于约11周、小于约10周、小于约9周、小于约8周、小于约7周、小于约6周、小于约5周、小于约4周、小于约3周、小于约2周或小于约1周。在某些实施方案中,耐受性时间为约4至约12周。在一个实施方案中,耐受性时间为约4周。在另一个实施方案中,耐受性时间为约12周。在一些实施方案中,耐受性时间为小于约10个月。在一些实施方案中,耐受性时间为小于约9个月。在一些实施方案中,耐受性时间为小于约8个月。在一些实施方案中,耐受性时间为小于约7个月。在一些实施方案中,耐受性时间为小于约6个月。在一些实施方案中,耐受性时间为小于约5个月。在一些实施方案中,耐受性时间为小于约4个月。在一些实施方案中,与单独用凝血因子治疗之后的耐受性时间相比,本公开的方法导致用包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白治疗之后人类的耐受性时间更短。

[0271] 在一些实施方案中,免疫耐受性的产生的特征在于抑制性抗体对凝血因子的效价小于约0.6BU。在一些实施方案中,免疫耐受性的产生的特征在于抑制性抗体对凝血因子的效价小于约0.5BU。在一些实施方案中,免疫耐受性的产生的特征在于抑制性抗体对凝血因子的效价小于约0.4BU。在一些实施方案中,免疫耐受性的产生的特征在于抑制性抗体对凝血因子的效价小于约0.3BU。在一些实施方案中,免疫耐受性的产生的特征在于抑制性抗体对凝血因子的效价小于约0.2BU。在一些实施方案中,免疫耐受性的产生的特征在于抑制性抗体对凝血因子的效价小于约0.1BU。在一些实施方案中,免疫耐受性的产生的特征在于抑制性抗体对凝血因子的效价为0.0BU。在某些实施方案中,在连续的两次测量下(例如,在四周时期内的连续两周中)观察到抑制性免疫抗体的效价。

[0272] 在一些实施方案中,免疫耐受性的产生的特征在于增量恢复率>66%(例如,增量恢复率为约67%、约68%、约69%、约70%、约71%、约72%、约73%、约74%、约75%、约76%、约77%、约78%、约79%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%)。如本文所用,“增量恢复率”是指输注之后15-30分钟的峰值FVIII水平。

[0273] 在诱导期和减量期完成之后,然后可以对受试者进行嵌合蛋白的预防治疗。示例性预防给药方案可为每四日约50IU/kg嵌合蛋白或在三至五日间隔下约25IU/kg至约65IU/kg嵌合蛋白。对于小于6岁的儿童,可给予每周两次约50IU/kg嵌合蛋白或在三至五日间隔下约25IU/kg至约65IU/kg嵌合蛋白。参见可在worldwideweb.eloctate.com/_assets/pdf/ELOCTATE_PI_January2017.pdf获得的ELOCTATE®药品说明书。

[0274] 在一些实施方案中,使用本公开的方法治疗的人类正接受或最近已接受免疫刺激疗法。例如,也在经历利用干扰素的治疗的HCV阳性A型血友病患者中以及患有与抗逆转录病毒疗法相关联的免疫重建炎性综合征的HIV阳性A型血友病患者中报导了抑制剂。参见欧洲药品管理局的FVIII产品和抑制剂发展专家会议报告(2006年2月28日-2006年3月2日)。因此,在一些实施方案中,人类正接受干扰素疗法。在一些实施方案中,人类正接受抗病毒疗法。在一些实施方案中,人类正接受抗逆转录病毒疗法并且患有免疫重建炎性综合征。

[0275] 在某些实施方案中,人类对凝血因子(例如,FVIII)已有小于150个暴露日(ED)。在一个实施方案中,人类已有小于50ED。在另一个实施方案中,人类已有小于20ED。

[0276] 本公开的一些方面涉及减小有需要的受试者的对凝血因子的过敏反应或类过敏反应的严重性或发生率的方法,其包括向所述受试者施用包含所述凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白。在一些实施方案中,所述组合物或所述嵌合蛋白的施用减小对所述凝血因子的类过敏反应的严重性。在一些实施方案中,所述组合物或所述嵌合蛋白的施用减小对所述凝血因子的过敏反应的严重性。

[0277] II.A. 嵌合蛋白

[0278] 本文所公开的诱导免疫耐受性的方法一般可适用于包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白,其中所述凝血因子可为任何已知的凝血因子、其片段或其变体,并且其中所述Fc区可为任何已知的Fc区、其片段或其变体。在一些实施方案中,凝血因子选自自由以下组成的组:因子VII (FVII)、因子VIIa (FVIIa)、因子VIII (FVIII)、因子IX (FIX)、因子X (FX)、冯·维勒布兰德因子 (VWF) 或其任何组合。因此,关于FVIIIFc嵌合蛋白及其用途的本公开同样适用于包含凝血因子部分和Fc区的其他嵌合蛋白。任何凝血因子、或其任何片段、或其任何变体均可用于本公开的方法。类似地,任何Fc因子、或其任何片段、或其任何变体均可用于本公开的方法。在一些具体实例中,嵌合蛋白的凝血因子部分为FVIII。

[0279] 在一些实施方案中,凝血因子和Fc存在于分开的多肽链上。在一些实施方案中,凝血因子和Fc未通过共价键彼此连接或缔合。

[0280] 在其他实施方案中,凝血因子可为凝血因子模拟物。凝血因子模拟物可展现出一个或多个凝血因子活性。例如,抗体或其抗体结合部分可通过结合至因子IX和因子X起类似FVIII的作用。如果抗体或其抗原结合部分含有Fc区,则此类抗体或其抗原结合部分可用于本方法。在另一个实施方案中,凝血因子为具有FVIII活性的肽。

[0281] 在此方面,本公开大体上提供一种诱导人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述受试者施用包含凝血因子部分和Fc部分的组合物或嵌合蛋白。

[0282] II.A.1. 因子VIII

[0283] 除非另外规定,否则如本文所用的“因子VIII”,在本申请书通篇缩写为“FVIII”,意指在凝血中发挥正常作用的功能性FVIII多肽。因此,术语FVIII包括具有功能性的变体多肽。“FVIII蛋白”可与FVIII多肽(或蛋白)或FVIII互换使用。FVIII功能的实例包括但不限于活化凝血的能力、充当因子IX的辅因子的能力、或在Ca²⁺和磷脂存在下与因子IX形成因子X活化酶(tenase)复合物的能力,该复合物然后将因子X转化成活化形式Xa。FVIII蛋白可为人类、猪、狗、大鼠或鼠类FVIII蛋白。此外,来自人类与其他物种的FVIII之间的比较已鉴别可能为功能所需的保守性残基(Cameron等,Thromb.Haemost.79:317-22(1998);US 6,251,632)。已知全长多肽和多核苷酸序列,也已知许多功能性片段、突变体和修饰形式。各种FVIII氨基酸和核苷酸序列公开于例如美国公开第2015/0158929 A1号、第2014/0308280 A1号和第2014/0370035A1号以及国际公开第WO 2015/106052 A1号中。FVIII多肽包括例如全长FVIII、全长FVIII减去N末端Met、成熟FVIII(减去信号序列)、在N末端具有另一Met的成熟FVIII和/或B结构域全部或部分缺失的FVIII。FVIII变体包括B结构域缺失,无论是部分缺失还是全部缺失。

[0284] 本文所用的凝血因子或嵌合蛋白中的FVIII部分具有FVIII活性。FVIII活性可通过本领域中任何已知方法测量。许多测试可用于评估凝血系统的功能:活化部分凝血致活酶时间(aPTT)测试、显色分析、ROTEM分析、凝血酶原时间(PT)测试(也用于确定INR)、纤维

蛋白原测试(通常通过克劳斯(Clauss)方法)、血小板计数、血小板功能测试(通常通过PFA-100)、TCT、出血时间、混合测试(如果患者的血浆与正常血浆混合,则是否进行异常校正)、凝血因子分析、抗磷脂抗体、D二聚体、遗传测试(例如,因子V Leiden、凝血酶原突变G20210A)、稀释鲁塞尔氏蝰蛇毒液时间(Russell's viper venom time, dRVVT)、混合血小板功能测试、凝血弹性描记术(TEG或Sonoclot)、凝血弹性测量术(TEM[®], 例如, ROTEM[®])或优球蛋白(euglobulin)溶解时间(ELT)。

[0285] aPTT测试为测量“内在”凝血途径(也称为接触活化途径)与共同凝血途径两者的功效的性能指针。此测试通常用于测量可商购的重组凝血因子(例如, FVIII)的凝血活性。所述测试与测量外在途径的凝血酶原时间(PT)结合使用。

[0286] ROTEM分析提供关于以下整个止血动力学的信息:凝血时间、凝块形成、凝块稳定性和溶解。凝血弹性测量术中的不同参数取决于血浆凝血系统的活性、血小板功能、纤维蛋白溶解或影响这些相互作用的许多因素。此分析可提供对次级止血的完全综述。

[0287] 显色分析机制基于凝血级联的原理,其中活化FVIII在活化因子IX、磷脂和钙离子存在下加速因子X转化成因子Xa。通过使针对因子Xa具有特异性的对硝基苯胺(pNA)底物水解来评估因子Xa活性。在405nm下测量的对硝基苯胺的初始释放速率与因子Xa活性成正比并且因此与样品中的FVIII活性成正比。

[0288] 显色分析由国际血栓暨止血学会(ISTH)的科学和标准化委员会(SSC)的FVIII和因子IX小组委员会所推荐。自1994年起,显色分析也已成为欧洲药典对FVIII浓缩效力(FVIII concentrate potency)的分配的参考方法。因此,在一个实施方案中,包含FVIII的嵌合蛋白具有可与包含成熟FVIII或BDD FVIII的嵌合蛋白(例如, ADVATE[®]、REFACTO[®]或ELOCTATE[®])相当的FVIII活性。

[0289] 在另一个实施方案中,本公开的包含FVIII的嵌合蛋白具有可与包含成熟FVIII或BDD FVIII的嵌合蛋白(例如, ADVATE[®]、REFACTO[®]或ELOCTATE[®])相当的因子Xa产生率。

[0290] 为了将因子X活化成因子Xa,活化因子IX(因子IXa)在Ca²⁺、膜磷脂和FVIII辅因子存在下水解因子X中的一个精氨酸-异亮氨酸键以形成因子Xa。因此,FVIII与因子IX的相互作用在凝血途径中为关键的。在某些实施方案中,包含FVIII的嵌合蛋白可在与包含成熟FVIII序列或BDD FVIII的嵌合蛋白(例如, ADVATE[®]、REFACTO[®]或ELOCTATE[®])相当的速率下与因子IXa相互作用。

[0291] 此外,FVIII结合至冯·维勒布兰德因子,同时在循环中为非活性的。FVIII当未结合至VWF时快速降解,并且通过凝血酶的作用从VWF释放。在一些实施方案中,包含FVIII的嵌合蛋白在可与包含成熟FVIII序列或BDD FVIII的嵌合蛋白(例如, ADVATE[®]、REFACTO[®]或ELOCTATE[®])相当的水平下结合至冯·维勒布兰德因子。

[0292] FVIII可在钙和磷脂存在下由活化蛋白C灭活。活化蛋白C裂解A1域中精氨酸336之后的FVIII重链,其破坏因子X底物相互作用位点,并且在A2结构域中精氨酸562之后进行裂解,其增强A2结构域的解离以及破坏与因子IXa的相互作用位点。此裂解也将A2结构域(43kDa)分成两部分并且产生A2-N(18kDa)和A2-C(25kDa)结构域。因此,活化蛋白C可催化

重链中的多个裂解位点。在一个实施方案中,包含FVIII的嵌合蛋白在可与包含成熟FVIII序列或BDD FVIII的嵌合蛋白(例如,ADVATE[®]、REFACTO[®]或ELOCTATE[®])相当的水平下由活化蛋白C灭活。

[0293] 在其他实施方案中,包含FVIII的嵌合蛋白具有可与包含成熟FVIII序列或BDD FVIII的嵌合蛋白(例如,ADVATE[®]、REFACTO[®]或ELOCTATE[®])相当的体内FVIII活性。在一个特定实施方案中,包含FVIII的嵌合蛋白能够在HemA小鼠尾静脉横切模型中在可与包含成熟FVIII序列或BDD FVIII的嵌合蛋白(例如,ADVATE[®]、REFACTO[®]或ELOCTATE[®])相当的水平下保护HemA小鼠。

[0294] 如本文所用的FVIII的“B结构域”与本领域中已知的通过内部氨基酸序列同一性和凝血酶的蛋白水解裂解位点定义的B结构域相同,例如成熟人类FVIII的残基Ser741-Arg1648。相对于成熟人类FVIII,其他人类FVIII结构域由以下氨基酸残基定义:A1,残基Ala1-Arg372;A2,残基Ser373-Arg740;A3,残基Ser1690-Ile2032;C1,残基Arg2033-Asn2172;C2,成熟FVIII的残基Ser2173-Tyr2332。除非另外指出,否则如本文所用的不指代任何SEQ ID数值的序列残基数值对应于无信号肽序列(19个氨基酸)的FVIII序列。A3-C1-C2序列(也称为FVIII重链)包括残基Ser1690-Tyr2332。剩余序列(残基Glu1649-Arg1689)通常称为FVIII轻链活化肽。猪、小鼠和狗FVIII的包括B结构域的所有结构域的边界位置也为本领域中已知的。在一个实施方案中,缺失FVIII的B结构域(“B结构域缺失FVIII”或“BDD FVIII”)。BDD FVIII的实例为REFACTO[®](重组BDD FVIII)。在一个特定实施方案中,所述B结构域缺失FVIII变体包含成熟FVIII的氨基酸残基746至1648的缺失。

[0295] “B结构域缺失FVIII”可具有在美国专利第6,316,226号、第6,346,513号、第7,041,635号、第5,789,203号、第6,060,447号、第5,595,886号、第6,228,620号、第5,972,885号、第6,048,720号、第5,543,502号、第5,610,278号、第5,171,844号、第5,112,950号、第4,868,112号和第6,458,563号以及国际公开第W0 2015106052 A1号(PCT/US2015/010738)中公开的全部或部分缺失。在一些实施方案中,本公开的方法中所用的B结构域缺失FVIII序列包含在美国专利第6,316,226号(也在US 6,346,513中)的第4栏第4行至第5栏第28行和实例1-5处公开的任一缺失。在另一个实施方案中,B结构域缺失因子VIII为S743/Q1638 B结构域缺失因子VIII(SQ BDD FVIII)(例如,具有从氨基酸744至氨基酸1637的缺失的因子VIII,例如具有成熟FVIII的氨基酸1-743和氨基酸1638-2332的因子VIII)。在一些实施方案中,本公开的方法中所用的B结构域缺失FVIII具有在美国专利第5,789,203号(也在US 6,060,447、US 5,595,886和US 6,228,620中)的第2栏第26-51行和实例5-8处公开的缺失。在一些实施方案中,B结构域缺失因子VIII具有以下文献中描述的缺失:美国专利第5,972,885号的第1栏第25行至第2栏第40行;美国专利第6,048,720号的第6栏第1-22行和实例1;美国专利第5,543,502号的第2栏第17-46行;美国专利第5,171,844号的第4栏第22行至第5栏第36行;美国专利第5,112,950号的第2栏第55-68行,图2和实例1;美国专利第4,868,112号的第2栏第2行至第19栏第21行和表2;美国专利第7,041,635号的第2栏第1行至第3栏第19行、第3栏第40行至第4栏第67行、第7栏第43行至第8栏第26行、和第11栏第5行至第13栏第39行;或美国专利第6,458,563号的第4栏第25-53行。在一些实施方案中,B结构域缺失FVIII缺失大部分B结构域,但仍然含有体内将初级翻译产物蛋白水解加工成两条多肽链所

必需的B结构域氨基末端序列,如WO 91/09122中所公开。在一些实施方案中,在缺失氨基酸747-1638,即实际上完全缺失B结构域下构建B结构域缺失FVIII。Hoeben R.C.等J.Biol.Chem.265(13):7318-7323(1990)。B结构域缺失因子VIII也可含有FVIII的氨基酸771-1666或氨基酸868-1562的缺失。Meulien P.等Protein Eng.2(4):301-6(1988)。作为本发明的一部分的其他B结构域缺失包括以下缺失:氨基酸982至1562或760至1639(Toole等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(1986)83,5939-5942)、797至1562(Eaton等Biochemistry(1986)25:8343-8347)、741至1646(Kaufman(PCT公开申请第WO 87/04187号)、747-1560(Sarver等,DNA(1987)6:553-564)、741至1648(Pasek(PCT申请第88/00831号)、或816至1598或741至1648(Lagner(Behring Inst.Mitt.(1988)第82期:16-25,EP 295597))。在一个特定实施方案中,所述B结构域缺失FVIII包含成熟FVIII的氨基酸残基746至1648的缺失。在另一特定实施方案中,所述B结构域缺失FVIII包含成熟FVIII的氨基酸残基745至1648的缺失。

[0296] 在其他实施方案中,BDD FVIII包括含有B结构域的保留一个或多个N-连接糖基化位点的片段的FVIII多肽,所述位点例如对应于全长FVIII序列的氨基酸序列的残基757、784、828、900、963或任选地943。B结构域片段的实例包括如Miao,H.Z.等,Blood 103(a):3412-3419(2004)、Kasuda,A等,J.Thromb.Haemost.6:1352-1359(2008)和Pipe,S.W.等,J.Thromb.Haemost.9:2235-2242(2011)中公开的B结构域的226个氨基酸或163个氨基酸(即保留B结构域的前226个氨基酸或163个氨基酸)。在其他实施方案中,BDD FVIII还包含在残基309处的点突变(从Phe至Ser)以改善BDD FVIII蛋白的表达。参见Miao,H.Z.等,Blood 103(a):3412-3419(2004)。在其他实施方案中,BDD FVIII包括含有一部分B结构域,但不含有一个或多个弗林蛋白酶裂解位点(例如Arg1313和Arg 1648)的FVIII多肽。参见Pipe,S.W.等,J.Thromb.Haemost.9:2235-2242(2011)。在一些实施方案中,BDD FVIII包含含有在对应于成熟全长FVIII的氨基酸765至1652中的缺失的单链FVIII(也称为rVIII-单链和AFSTYLA®)。参见美国专利第7,041,635号。可在任何FVIII序列中进行各前述缺失。

[0297] 已知大量功能性FVIII变体,也如上文和下文所讨论。此外,已在血友病患者中识别出FVIII的数百个非功能性突变,并且已确定,这些突变对于FVIII功能的作用与对于取代基性质的作用相比更多是由于其处于FVIII的3维结构内(Cutler等,Hum.Mutat.19:274-8(2002)),所述参考文献以全文引用的方式并入本文中。此外,来自人类与其他物种的FVIII之间的比较已识别出可能为功能所需的保守残基(Cameron等,Thromb.Haemost.79:317-22(1998);US 6,251,632),所述参考文献以全文引用的方式并入本文中。

[0298] 在一些实施方案中,包含FVIII和Fc区的嵌合蛋白的有效量等效于无Fc区的FVIII的有效量。在某些实施方案中,所述有效量为约20IU/Kg至约400IU/kg。在某些实施方案中,所述有效量为约20IU/Kg至约300IU/kg。在一些实施方案中,所述有效量为约50IU/Kg至约300IU/kg。在一些实施方案中,所述有效量为约50IU/kg至约200IU/kg。在一些实施方案中,所述有效量为约100IU/kg至约300IU/kg、约100IU/kg至约200IU/kg、约100IU/kg至约290IU/kg、约100IU/kg至约280IU/kg、约100IU/kg至约270IU/kg、约100IU/kg至约260IU/kg、约100IU/kg至约250IU/kg、约100IU/kg至约240IU/kg、约100IU/kg至约230IU/kg、约100IU/kg至约220IU/kg、约100IU/kg至约210IU/kg、约150IU/kg至约300IU/kg、约150IU/kg至约290IU/kg、约150IU/kg至约280IU/kg、约150IU/kg至约270IU/kg、约150IU/kg至约

260IU/kg、约150IU/kg至约250IU/kg、约150IU/kg至约240IU/kg、约140IU/kg至约250IU/kg、约130IU/kg至约260IU/kg、约120IU/kg至约270IU/kg、约110IU/kg至约280IU/kg。在一个特定实施方案中,所述有效量为约200IU/kg至约300IU/kg。在另一个实施方案中,所述有效量为约200IU/kg至约290IU/kg。在其他实施方案中,所述有效量为约200IU/kg至约280IU/kg、约200IU/kg至约270IU/kg、约200IU/kg至约260IU/kg、约200IU/kg至约250IU/kg、约200IU/kg至约240IU/kg、约200IU/kg至约230IU/kg、约200IU/kg至约220IU/kg或约200IU/kg至约210IU/kg。

[0299] 在一些实施方案中,所述有效量为约50IU/kg、约60IU/kg、约70IU/kg、约80IU/kg、约90IU/kg、约100IU/kg、约105IU/kg、约110IU/kg、约115IU/kg、约120IU/kg、约125IU/kg、约130IU/kg、约135IU/kg、约140IU/kg、约145IU/kg、约150IU/kg、约155IU/kg、约160IU/kg、约165IU/kg、约170IU/kg、约175IU/kg、约180IU/kg、约185IU/kg、约190IU/kg、约195IU/kg、约200IU/kg、约225IU/kg、约250IU/kg、约275IU/kg或约300IU/kg。在一个特定实施方案中,所述有效量为约150IU/kg。在另一个实施方案中,所述有效量为约200IU/kg。在另一个实施方案中,所述有效量为约250IU/kg。在另一个实施方案中,所述有效量为约50IU/kg。在另一个实施方案中,所述有效量为约100IU/kg。

[0300] 施用包含FVIII和Fc区的嵌合蛋白或其片段时的给药间隔可比等效剂量无Fc区的凝血因子所需的给药间隔长至少约一倍半。给药间隔可比等效剂量无Fc结构域的FVIII所需的给药间隔长至少约一倍半至六倍、长一倍半至五倍、长一倍半至四倍、长一倍半至三倍或长一倍半至两倍。

[0301] 在一些实施方案中,有效剂量的包含FVIII和Fc区的嵌合蛋白以以下给药间隔向人类施用:约一日、约两日、约三日、约四日、约五日、约六日、约七日、约八日、约九日、约十日、约十一日、约十二日、约十三日、约十四日、约十五日、约十六日、约十七日、约十八日、约十九日、约二十日、约二十一日、约二十二日、约二十三日或约二十四日。在一些实施方案中,有效剂量的包含FVIII和Fc区的嵌合蛋白以以下给药间隔向人类施用:约25日、约26日、约27日、约28日、约29日、约30日、约45日或约60日。

[0302] 在一些实施方案中,包含FVIII和Fc区的组合物或嵌合蛋白以以下给药间隔施用:约1至约14日、约1至约13日、约1至约12日、约1至约11日、约1至约10日、约1至约9日、约1至约8日、约1至约7日、约1至约6日、约1至约5日、约1至约4日、约1至约3日、约1至约2日、约2至约14日、约3至约14日、约4至约14日、约5至约14日、约6至约14日、约7至约14日、约8至约14日、约9至约14日、约10至约14日、约11至约14日、约12至约14日、约13至约14日或约5至约10日。在其他实施方案中,包含FVIII和Fc区的组合物或嵌合蛋白以以下给药剂量施用:约1至约21日、约1至约20日、约1至约19日、约1至约18日、约1至约17日、约1至约16日、约1至约15日、约1至约14日、约1至约13日、约1至约12日、约1至约11日、约1至约10日、约1至约9日、约1至约8日、约1至约7日、约1至约6日、约1至约5日、约1至约4日、约1至约3日、约1至约2日、约2至约21日、约3至约21日、约4至约21日、约5至约21日、约6至约21日、约7至约21日、约8至约21日、约9至约21日、约10至约21日、约11至约21日、约12至约21日、约13至约21日、约14至约21日、约15至约21日、约16至约21日、约17至约21日、约18至约21日、约19至约21日、约20至约21日、约5至约10日、约10至约15日、约15至约20日。在某些实施方案中,包含FVIII和Fc区的组合物或嵌合蛋白以约2至约6日的给药间隔施用。在另一个实施方案中,包含FVIII和Fc

区的组合物或嵌合蛋白以约3至约5日的给药间隔施用。

[0303] 在一个实施方案中,所述有效剂量为25-65IU/kg (25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、62、64或65IU/kg),并且所述给药间隔为每3-5、3-6、3-7、3、4、5、6、7或8或更多日一次、或每周三次、或每周不多于三次。在另一个实施方案中,所述有效剂量为65IU/kg,并且所述给药间隔为每周一次、或每6-7日一次。只要是必要的,所述剂量可重复施用(例如,至少10、20、28、30、40、50、52、或57周,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10年)。在一个特定实施方案中,所述有效剂量为约25-65IU/kg,并且所述给药间隔为每3-5日一次。

[0304] 在一个实施方案中,所述有效量为约200IU/kg,并且所述有效量为每日施用。在另一个实施方案中,所述有效量为约50IU/kg,并且所述有效量为施用一周约三次。

[0305] 在某些实施方案中,所述有效量或所述有效剂量以单一剂量形式施用。在一些实施方案中,所述有效量或所述有效剂量以全天二个或更多个剂量施用。

[0306] 在一些实施方案中,包含FVIII和Fc区的组合物或嵌合蛋白以约200IU/kg的剂量向人类每日一次施用,直至观察到耐受作用。在一些实施方案中,耐受作用期延续约4周至约36个月。在一些实施方案中,耐受作用期延续约4周、约5周、约6周、约7周、约8周、约9周、约10周、约11周、约12周、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约7个月、约8个月、约9个月、约10个月、约11个月、约12个月、约13个月、约14个月、约15个月、约16个月、约17个月、约18个月、约19个月、约20个月、约21个月、约22个月、约23个月、约24个月、约25个月、约26个月、约27个月、约28个月、约29个月、约30个月、约31个月、约32个月、约33个月、约34个月、约35个月或约36个月。

[0307] 在某些实施方案中,一旦实现免疫耐受性,人类便应经受减量期。如本文所用,术语“减量期”和“减量方案”可互换用于指代施用一个或多个减量剂量的给药方案。在一些实施方案中,所述减量期包括施用药约20IU/Kg至约400IU/kg。在某些实施方案中,所述减量期包括施用药约20IU/Kg至约300IU/kg。在一些实施方案中,所述减量期包括施用药约50IU/Kg至约300IU/kg。在一些实施方案中,所述减量期包括施用药约50IU/Kg至约100IU/kg。在一些实施方案中,所述减量期包括施用药约100IU/kg至约300IU/kg、约100IU/kg至约200IU/kg、约100IU/kg至约290IU/kg、约100IU/kg至约280IU/kg、约100IU/kg至约270IU/kg、约100IU/kg至约260IU/kg、约100IU/kg至约250IU/kg、约100IU/kg至约240IU/kg、约100IU/kg至约230IU/kg、约100IU/kg至约220IU/kg、约100IU/kg至约210IU/kg、约150IU/kg至约300IU/kg、约150IU/kg至约290IU/kg、约150IU/kg至约280IU/kg、约150IU/kg至约270IU/kg、约150IU/kg至约260IU/kg、约150IU/kg至约250IU/kg、约150IU/kg至约240IU/kg、约140IU/kg至约250IU/kg、约130IU/kg至约260IU/kg、约120IU/kg至约270IU/kg、约110IU/kg至约280IU/kg。在一个特定实施方案中,所述减量期包括施用药约200IU/kg至约300IU/kg。在另一个实施方案中,所述减量期包括施用药约200IU/kg至约290IU/kg。在其他实施方案中,所述减量期包括施用药约200IU/kg至约280IU/kg、约200IU/kg至约270IU/kg、约200IU/kg至约260IU/kg、约200IU/kg至约250IU/kg、约200IU/kg至约240IU/kg、约200IU/kg至约230IU/kg、约200IU/kg至约220IU/kg或约200IU/kg至约210IU/kg。在另一个实施方案中,所述减量方案包括施用减量剂量约50IU/kg至约100IU/kg的组合物或嵌合蛋白。在一个特定实施方案中,所述减量方案包括施用减量剂量约50IU/kg的组合物或嵌合蛋白。在另一个实施方案

中,所述减量方案包括施用减量剂量约150IU/kg的组合物或嵌合蛋白。在另一个实施方案中,所述减量方案包括施用减量剂量约125IU/kg的组合物或嵌合蛋白。在另一特定实施方案中,所述减量方案包括施用减量剂量约100IU/kg的组合物或嵌合蛋白。在另一个实施方案中,所述减量方案包括施用减量剂量约90IU/kg的组合物或嵌合蛋白。在另一个实施方案中,所述减量方案包括施用减量剂量约80IU/kg的组合物或嵌合蛋白。在另一个实施方案中,所述减量方案包括施用减量剂量约75IU/kg的组合物或嵌合蛋白。在另一个实施方案中,所述减量方案包括施用减量剂量约70IU/kg的组合物或嵌合蛋白。在另一个实施方案中,所述减量方案包括施用减量剂量约60IU/kg的组合物或嵌合蛋白。在另一个实施方案中,所述减量方案包括施用减量剂量约40IU/kg的组合物或嵌合蛋白。在另一个实施方案中,所述减量方案包括施用减量剂量约30IU/kg的组合物或嵌合蛋白。在另一个实施方案中,所述减量方案包括施用减量剂量约25IU/kg的组合物或嵌合蛋白。在另一个实施方案中,所述减量方案包括施用减量剂量约20IU/kg的组合物或嵌合蛋白。在另一个实施方案中,所述减量方案包括施用减量剂量约10IU/kg的组合物或嵌合蛋白。

[0308] 在一些实施方案中,所述减量期包括每日施用组合物或嵌合蛋白。在其他实施方案中,所述减量期包括施用组合物或嵌合蛋白约每两日一次、约每三日一次、约每四日一次、约每五日一次、约每六日一次、约每七日一次、约每八日一次、约每九日一次、约每十日一次、约每十一日一次、约每十二日一次、约每十三日一次、或约每十四日一次。

[0309] 在某些实施方案中,所述减量剂量为一日一次、每隔一日一次或每周三次施用。在一些实施方案中,所述减量剂量施用至少约1周、至少约2周、至少约3周、至少约4周、至少约5周、至少约6周、至少约7周、至少约8周、至少约9周、至少约10周、至少约11周、至少约12周、至少约13周、至少约14周、至少约15周、至少约16周、至少约17周、至少约18周、至少约19周、至少约20周、至少约21周、至少约22周、至少约23周、至少约24周、至少约25周、至少约26周、至少约27周、至少约28周、至少约29周、至少约30周、至少约31周或至少约32周。在一个特定实施方案中,所述减量剂量施用于约16周或更短时间。

[0310] 在某些实施方案中,组合物或嵌合蛋白的剂量在减量期期间逐渐减小,并且给药间隔保持相同。在其他实施方案中,给药间隔在减量期期间增加,并且组合物或嵌合蛋白的剂量保持相同。在一些实施方案中,组合物或嵌合蛋白的剂量在减量期期间逐渐减少,并且给药间隔逐渐增加。

[0311] 在一个特定实施方案中,所述减量期包括每隔一日施用于约200IU/kg嵌合凝血因子,接着进一步减小剂量和给药间隔。在其他实施方案中,一日所需的嵌合蛋白的剂量可分成两个剂量、三个剂量或更多剂量。例如,约200IU/kg嵌合蛋白可分成约100IU/kg一日两次、约70IU/kg一日三次或约50IU/kg一日四次。

[0312] 在一些实施方案中,减量期延续约1个月至约6个月。在某些实施方案中,减量期延续约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月或约6个月。在一个特定实施方案中,减量期延续约4个月。

[0313] 在某些实施方案中,所述减量方案包括在免疫耐受性之后从第1周至第6周一日一次施用减量剂量约100IU/kg的所述嵌合蛋白。在某些实施方案中,所述减量方案还包括在免疫耐受性之后从第6周至第12周每隔一日一次施用减量剂量约100IU/kg的所述嵌合蛋白。在某些实施方案中,所述减量方案还包括从第12周至第16周每隔一日一次施用减量剂

量约50IU/kg的所述嵌合蛋白。

[0314] 在一些实施方案中,减量期在追踪期之前。在一些实施方案中,追踪期包括用组合物或嵌合蛋白进行预防治疗。在一些实施方案中,追踪期包括用凝血因子进行预防治疗。追踪期中所用的凝血因子可选自耐受作用期和减量期中所用的凝血因子(有或无Fc区)及其任何变体。凝血因子可包括但不限于原生凝血因子、本文所述的任何变体(例如,FVIII的B结构域缺失变体)和本文所述的任何嵌合凝血因子(例如,FVIII-Fc、FVIII-白蛋白等)。在某些实施方案中,预防治疗包括施用批准的预防剂量的例如重组FVIIIFc。在一些实施方案中,所述预防治疗包括25-65IU/kg(25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、62、64或65IU/kg),并且所述给药间隔为每3-5、3-6、3-7、3、4、5、6、7或8或更多日一次、或每周三次、或每周不多于三次。在另一个实施方案中,所述预防治疗包括65IU/kg,并且所述给药间隔为每周一次或每6-7日一次。在另一个实施方案中,所述预防治疗包括施用剂量50IU/kg的凝血因子。在另一个实施方案中,所述预防治疗包括施用剂量50IU/kg的凝血因子,并且所述给药间隔为每周约三次。在一个特定实施方案中,所述预防治疗包括约25-65IU/kg,并且所述给药间隔为每3-5日一次。在某些实施方案中,追踪期延续约8个月。

[0315] 在一个特定实施方案中,嵌合蛋白(例如,FVIIIFc)以约200IU/kg/日施用,直至观察到免疫耐受性,例如,当人类的抑制性抗体的效价小于约0.6BU时;然后,在免疫耐受性之后,施用减量方案,其中所述减量方案包括在免疫耐受性之后第1周至第6周施用减量剂量约100IU/kg的嵌合蛋白(例如,FVIIIFc)一日一次、在免疫耐受性之后第6周至第12周施用减量剂量约100IU/kg的嵌合蛋白(例如,FVIIIFc)每隔一日一次、以及在第12周至第16周施用减量剂量约50IU/kg的嵌合蛋白(例如,FVIIIFc)每隔一日一次;然后,在减量方案之后,施用预防剂量约50IU/kg的凝血因子每周约三次。

[0316] 包含FVIII和Fc区的组合物或嵌合蛋白可被配制用于任何适当施用方式,包括例如局部(例如,经皮或眼部)、经口、经颊、经鼻、经阴道、经直肠或非经肠施用。

[0317] 如本文所用的术语非经肠包括皮下、皮内、血管内(例如,静脉内)、肌肉内、脊椎、颅内、鞘内、眼内、眼周、眶内、滑膜内和腹膜内注射以及任何类似注射或输注技术。组合物也可例如悬浮液、乳液、持续释放制剂、乳膏、凝胶或散剂。组合物可用传统粘合剂和载剂(诸如三酸甘油酯)配制成栓剂。

[0318] 在一个实例中,药物制剂为液体制剂,例如缓冲等张水溶液。在另一实例中,药物组合物具有生理性或接近于生理性的pH值。在其他实例中,水性制剂具有生理性或接近于生理性的摩尔渗透压浓度和盐度。所述制剂可含有氯化钠和/或乙酸钠。

[0319] 在一些实施方案中,本发明的方法中所用的包含FVIII和Fc区的嵌合蛋白被配制在包含以下的药物组合物中:(a)嵌合蛋白;(b)一种或多种选自蔗糖、海藻糖、棉子糖、精氨酸或其混合物的稳定剂;(c)氯化钠(NaCl);(d)L-组氨酸;(e)氯化钙;以及(f)聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80。在某些实施方案中,所述药物组合物包含:(a)50IU/ml至2500IU/ml嵌合蛋白;(b)10mg/ml至25mg/ml蔗糖;(c)8.8mg/ml至14.6mg/ml氯化钠(NaCl);(d)0.75mg/ml至2.25mg/ml L-组氨酸;(e)0.75mg/ml至1.5mg/ml二水合氯化钙;以及(f)0.08mg/ml至0.25mg/ml聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80。在一些实例中,本公开的方法中所用的药物组合物为冻干的。

[0320] 在一些实施方案中,所述药物组合物不包含免疫细胞。在一些实施方案中,所述药物组合物不包含细胞。

[0321] 在某些实施方案中,使用本公开的方法治疗的人类先前产生FVIII抑制性免疫反应。在一些实施方案中,先前产生的FVIII抑制性反应响应于重组FVIII而产生。在一些实施方案中,先前产生的FVIII抑制性反应响应于选自由以下组成的组的FVIII产品而产生: ADVATE[®]、RECOMBIMATE[®]、KOGENATEFS[®]、HELIXATEFS[®]、XYNTHA/REFACTO AB[®]、HEMOFIL-M[®]、MONARC-M[®]、MONOCLATE-P[®]、HUMATE-P[®]、ALPHANATE[®]、KOATE-DVI[®]、AFSTYLA[®]和HYATE:C[®]。

[0322] 在一些实施方案中,一旦根据抑制性抗体的减小的效价达到耐受作用,便使凝血因子的血清水平维持在约100IU/dL至约200IU/dL。在一些实施方案中,在开始减量方案之前将组合物或嵌合蛋白的有效量减小,以使凝血因子的血清水平维持在约100IU/dL至约200IU/dL。在某些实施方案中,如果凝血因子的血清水平大于或等于200IU/dL,则将组合物或嵌合蛋白的有效量减小至约175IU/kg/日。在某些实施方案中,如果凝血因子的血清水平大于或等于200IU/dL,则将组合物或嵌合蛋白的有效量减小至约150IU/kg/日。在某些实施方案中,如果凝血因子的血清水平大于或等于200IU/dL,则将组合物或嵌合蛋白的有效量减小至约125IU/kg/日。在某些实施方案中,如果凝血因子的血清水平大于或等于200IU/dL,则将组合物或嵌合蛋白的有效量减小至约100IU/kg/日。在某些实施方案中,如果凝血因子的血清水平大于或等于200IU/dL,则将组合物或嵌合蛋白的有效量减小至约75IU/kg/日。在某些实施方案中,如果凝血因子的血清水平大于或等于200IU/dL,则将组合物或嵌合蛋白的有效量减小至约50IU/kg/日。在某些实施方案中,如果凝血因子的血清水平大于或等于200IU/dL,则将组合物或嵌合蛋白的有效量减小至约25IU/kg/日。

[0323] 本公开的某些方面涉及诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用约200IU/kg的包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白。在某些实施方案中,组合物或嵌合蛋白每隔一日施用。在其他实施方案中,组合物或嵌合蛋白每日施用。

[0324] 在其他方面中,本公开涉及诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用约202IU/kg的包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白。在某些实施方案中,组合物或嵌合蛋白每日施用。

[0325] 在其他方面中,本公开涉及诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用约150IU/kg的包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白。在某些实施方案中,组合物或嵌合蛋白每日施用。

[0326] 在其他方面中,本公开涉及诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用约130IU/kg的包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白。在某些实施方案中,组合物或嵌合蛋白每日施用。

[0327] 在其他方面中,本公开涉及诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用约115IU/kg的包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白。在某些实施方案中,组合物或嵌合蛋白每隔一日施用。

[0328] 在其他方面中,本公开涉及诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用约100IU/kg的包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白。在某些实施方案

中,组合物或嵌合蛋白每日施用。在其他实施方案中,组合物或嵌合蛋白每周三次施用。

[0329] 在其他方面中,本公开涉及诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用约102IU/kg的包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白。在某些实施方案中,组合物或嵌合蛋白每隔一日施用。

[0330] 在其他方面中,本公开涉及诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用约96IU/kg的包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白。在某些实施方案中,组合物或嵌合蛋白每日施用。

[0331] 在其他方面中,本公开涉及诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用约85IU/kg的包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白。在某些实施方案中,组合物或嵌合蛋白每日施用。

[0332] 在其他方面中,本公开涉及诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用约50IU/kg的包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白。在某些实施方案中,组合物或嵌合蛋白每周三次施用。

[0333] 本公开的某些方面涉及诱导患有血友病的人类的免疫耐受性的方法,其包括(1)向所述人类施用约200IU/kg的包含凝血因子和Fc区的组合物或嵌合蛋白,其中所述组合物或所述嵌合蛋白诱导所述人类的免疫耐受性;以及(2)在诱导免疫耐受性之后,向所述人类施用减量方案的所述组合物或所述嵌合蛋白。

[0334] II.A.2 Fc

[0335] 在一些实施方案中,本公开的组合物、嵌合蛋白和/或凝血因子包含结合至Fc受体(FcR;例如,FcRn)的Fc结构域或其一部分。在一些实施方案中,Fc结构域融合至凝血因子,例如作为包含凝血因子和Fc区的嵌合蛋白的一部分。在其他实施方案中,Fc结构域融合至除凝血因子之外的多肽,其中所述组合物包含(1)凝血因子和(2)包含Fc结构域和另一多肽的嵌合蛋白。Fc结构域或其一部分可改善嵌合蛋白的药物动力学或药效动力学性质。在某些实施方案中,Fc结构域或其一部分延长融合至所述Fc结构域或其一部分的分子的半衰期。

[0336] 如本文所用,除非另外规定,否则如本文所用的术语“Fc区”的“Fc结构域”意指功能性FcR(例如,FcRn)结合配偶体。Fc结构域为多肽中对应于原生Ig的Fc结构域的部分,即如通过其两条重链的相应Fc结构域的二聚缔合所形成。原生Fc结构域与另一Fc结构域形成同源二聚体。相反,如本文所用的术语“遗传融合Fc区”或“单链Fc区”(scFc区)是指合成二聚Fc区,其包含在单一多肽链内遗传连接的Fc结构域(即,在单一连续遗传序列中编码)。

[0337] 在一个实施方案中,“Fc区”是指单一Ig重链的一部分,其在恰好在木瓜蛋白酶裂解位点(即IgG中的残基216,将重链恒定区的第一残基看作114)上游的铰链区中开始并且在抗体的C末端处结束。因此,完全Fc结构域至少包含铰链域、CH2结构域和CH3结构域。

[0338] 根据Ig同种型,Ig恒定区的Fc区可包含CH2、CH3和CH4结构域以及铰链区。包含Ig的Fc区的嵌合蛋白对嵌合蛋白赋予若干希望的性质,包括增强的稳定性、增加的血清半衰期(参见Capon等,1989,Nature 337:525)以及结合至Fc受体,诸如新生Fc受体(FcRn)(美国专利第6,086,875号、第6,485,726号、第6,030,613号;WO 03/077834;US2003-0235536A1),所述专利以全文引用的方式并入本文中。

[0339] 已从包括人类的若干哺乳动物物种分离FcRn受体。已知人类FcRn、猴FcRn、大鼠

FcRn和小鼠FcRn的序列(Story等1994, J. Exp. Med. 180:2377)。FcRn受体在相对较低pH值下结合IgG(但不结合其他Ig类别,诸如IgA、IgM、IgD和IgE),在内腔至浆膜方向跨细胞主动转运IgG,并且然后在间隙液中存在的相对较高pH值下释放IgG。所述受体表达在成人上皮组织(美国专利第6,485,726号、第6,030,613号、第6,086,875号;WO 03/077834;US2003-0235536A1),包括肺和肠上皮(Israel等1997, Immunology 92:69)、肾近端管状上皮(Kobayashi等2002, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 282:F358)以及鼻上皮;阴道表面、以及胆系表面中。

[0340] 适用于本发明中的Fc区涵盖可特异性结合FcR的分子,包括完整IgG、IgG的Fc片段、以及包含FcR的完全结合区的其他片段。与例如FcRn受体结合的IgG的Fc部分的区域已基于X-射线晶体衍射得以描述(Burmeister等,1994, Nature 372:379)。Fc与FcRn的主要接触区域接近CH2结构域与CH3结构域的接合点。Fc-FcRn接触区全部在单一Ig重链内。Fc区包括完整IgG、IgG的Fc片段和IgG中包含FcRn的完整结合区的其他片段。主要接触位点包括CH2结构域的氨基酸残基248、250-257、272、285、288、290-291、308-311和314,以及CH3结构域的氨基酸残基385-387、428和433-436。对Ig或Ig片段或区域的氨基酸编号的提及全部基于Kabat等1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md。

[0341] 特异性结合是指两个分子在生理条件下形成相对稳定的复合物。特异性结合的特征在于亲和力较高且能力低至中等,如与通常亲和力较低且能力中等至较高的非特异性结合相区分。通常,当亲和力常数 K_A 高于 $10^6 M^{-1}$ 或高于 $10^8 M^{-1}$ 时,结合被认为是特异性结合。必要时,可通过改变结合条件来降低非特异性结合而不实质上影响特异性结合。诸如分子浓度、溶液的离子强度、温度、允许结合时间、阻断剂(例如血清白蛋白、奶酪蛋白)浓度等的适当结合条件可由熟练技术人员使用常规技术加以优化。

[0342] 在某些实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含一个或多个截短Fc区,尽管如此,所述Fc区仍足以对Fc区赋予FcR结合性质。例如,Fc区的结合FcRn的部分(即FcRn结合部分)包含IgG1的约氨基酸282-438(EU编号),其中主要接触位点为CH2结构域的氨基酸248、250-257、272、285、288、290-291、308-311和314以及CH3结构域的氨基酸残基385-387、428和433-436。因此,本发明的Fc区可包含FcRn结合部分或由FcRn结合部分组成。

[0343] FcR结合部分可源于包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的任何同种型的重链。在一个实施方案中,使用来自具有人类同种型IgG1的抗体的FcR结合部分。在另一个实施方案中,使用来自具有人类同种型IgG4的抗体的FcR结合部分。

[0344] 在另一个实施方案中,“Fc区”包含Fc结构域或源于Fc结构域的氨基酸序列。在某些实施方案中,Fc区包含以下至少一者:铰链(例如上、中和/或下铰链区)结构域(抗体Fc区的约氨基酸216-230,根据EU编号)、CH2结构域(抗体Fc区的约氨基酸231-340,根据EU编号)、CH3结构域(抗体Fc区的约氨基酸341-438,根据EU编号)、CH4结构域、或其变体、部分或片段。在其他实施方案中,Fc区包含完全Fc结构域(即铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域)。在一些实施方案中,Fc区包含以下项、基本上由以下项组成、或由以下项组成:融合于CH3结构域(或其部分)的铰链结构域(或其部分)、融合于CH2结构域(或其部分)的铰链域(或其部分)、融合于CH3结构域(或其部分)的CH2结构域(或其部分)、融合于铰链结构域(或其部分)和CH3结构域(或其部分)两者的CH2结构域(或其部分)。在其他实施方案中,Fc区缺

乏CH2结构域的至少一部分(例如CH2结构域的全部或一部分)。在一个特定实施方案中,Fc区包含以下项或由以下项组成:对应于EU编号221至447的氨基酸。

[0345] 在本文中表示为F、F1或F2的Fc区可从许多不同来源获得。在一个实施方案中,多肽的Fc区源于人类Ig。然而,应了解Fc区可源于另一哺乳动物物种的Ig,所述物种包括例如啮齿动物(例如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)或非人灵长类动物(例如黑猩猩、猕猴)物种。此外,Fc结构域或其部分的多肽可源于任何Ig类别(包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE)和任何Ig同种型(包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。在另一个实施方案中,使用人类同种型IgG1。

[0346] 在某些实施方案中,Fc变体赋予由包含野生型Fc结构域的Fc区赋予的至少一种效应功能的变化(例如,Fc区结合至Fc受体(例如,与Fc γ RI、Fc γ RII或Fc γ RIII的结合改善或降低)、补体蛋白(例如C1q)或其他Fc结合配偶体(例如,DC-SIGN),或触发抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、吞噬作用或补体依赖性细胞毒性(CDCC)的能力改善或降低)。在其他实施方案中,Fc变体提供工程改造的半胱氨酸残基。

[0347] 本发明的Fc区可采用本领域认可的已知会赋予效应功能和/或FcR或FcRn结合变化(例如增强或降低)的Fc变体。具体而言,本发明的结合分子可包括例如在以下项中公开的一个或多个氨基酸位置处的变化(例如,取代):国际PCT公开W088/07089A1、W096/14339A1、W098/05787A1、W098/23289A1、W099/51642A1、W099/58572A1、W000/09560A2、W000/32767A1、W000/42072A2、W002/44215A2、W002/060919A2、W003/074569A2、W004/016750A2、W004/029207A2、W004/035752A2、W004/063351A2、W004/074455A2、W004/099249A2、W005/040217A2、W004/044859、W005/070963A1、W005/077981A2、W005/092925A2、W005/123780A2、W006/019447A1、W006/047350A2和W006/085967A2;美国专利公开第US2007/0231329号、第US2007/0231329号、第US2007/0237765号、第US2007/0237766号、第US2007/0237767号、第US2007/0243188号、第US2007/0248603号、第US2007/0286859号、第US2008/0057056号;或美国专利5,648,260;5,739,277;5,834,250;5,869,046;6,096,871;6,121,022;6,194,551;6,242,195;6,277,375;6,528,624;6,538,124;6,737,056;6,821,505;6,998,253;7,083,784;7,404,956和7,317,091。在一个实施方案中,可在一个或多个公开的氨基酸位置处进行特定改变(例如特定取代本领域中公开的一个或多个氨基酸)。在另一个实施方案中,可在一个或多个公开的氨基酸位置处进行不同改变(例如本领域中公开的一个或多个氨基酸位置的不同取代)。

[0348] Fc区可根据充分认可的程序(诸如定点诱变及其类似程序)进行修饰以产生将由Fc γ RIIB和/或DC-SIGN结合的修饰的Fc片段或部分。这些修饰包括保持或甚至增强与Fc γ RIIB和/或DC-SIGN结合的远离Fc γ RIIB和/或DC-SIGN接触位点的修饰以及在接触位点内的修饰。例如,可取代人类IgG1Fc(Fc γ 1)中的以下单一氨基酸残基而不显著损失Fc对Fc γ RIIB和/或DC-SIGN的结合亲和力:P238A、S239A、K246A、K248A、D249A、M252A、T256A、E258A、T260A、D265A、S267A、H268A、E269A、D270A、E272A、L274A、N276A、Y278A、D280A、V282A、E283A、H285A、N286A、T289A、K290A、R292A、E293A、E294A、Q295A、Y296F、N297A、S298A、Y300F、R301A、V303A、V305A、T307A、L309A、Q311A、D312A、N315A、K317A、E318A、K320A、K322A、S324A、K326A、A327Q、P329A、A330Q、P331A、E333A、K334A、T335A、S337A、K338A、K340A、Q342A、R344A、E345A、Q347A、R355A、E356A、M358A、T359A、K360A、N361A、Q362A、Y373A、S375A、D376A、A378Q、E380A、E382A、S383A、N384A、Q386A、E388A、N389A、N390A、

Y391F、K392A、L398A、S400A、D401A、D413A、K414A、R416A、Q418A、Q419A、N421A、V422A、S424A、E430A、N434A、T437A、Q438A、K439A、S440A、S444A和K447A,其中例如P238A表示在位置编号238处野生型脯氨酸被丙氨酸取代。例如,一个具体实施方案并有N297A突变,从而去除高度保守的N-糖基化位点。除丙氨酸之外,其他氨基酸也可在以上指定的位置处取代野生型氨基酸。突变可逐一引入Fc中,从而产生多于一百个不同于原生Fc的Fc区。另外,两个、三个或更多个这些个别突变的组合可一起引入,从而产生数百个以上Fc区。此外,本发明的构建体的一个Fc区可为突变的并且所述构建体的另一Fc区完全不突变,或其两者均可突变的,但突变不同。

[0349] 某些以上突变可对Fc区或FcRn结合配偶体赋予新功能性。例如,一个实施方案并有N297A,从而去除高度保守的N-糖基化位点。此突变的作用在于降低免疫原性,从而增强Fc区的循环半衰期,并在不损害对FcRn的亲合力下致使Fc区不能结合Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB和Fc γ RIIIA (Routledge等1995, *Transplantation* 60:847; Friend等1999, *Transplantation* 68:1632; Shields等1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591)。作为由于上述突变而产生的新功能性的另一实例,对FcRn的亲合力在一些情况下可增加超过野生型对FcRn的亲合力。此亲合力增加可反映“缔合”速率增加、“解离”速率降低、或“缔合”速率增加与“解离”速率降低两者。据信会赋予对FcRn的亲合力增加的突变的实例包括但不限于T256A、T307A、E380A和N434A (Shields等2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591)。

[0350] 另外,至少三种人类Fc γ 受体似乎识别IgG上在下较链区内的结合位点,通常为氨基酸234-237。因此,新功能性和潜在免疫原性降低的另一实例可由此区域的突变引起,如例如通过将人类IgG1的氨基酸233-236“ELLG”置换成来自IgG2的相应序列“PVA”(其中有一个氨基酸缺失)。已显示当已引入此类突变时,介导各种效应功能的Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII将不结合至IgG1。Ward和Ghetie 1995, *Therapeutic Immunology* 2:77和Armour等1999, *Eur. J. Immunol.* 29:2613。

[0351] 在一个实施方案中,Fc结构域或其部分为多肽,包括美国专利第5,739,277号的SEQ ID NO:3并且任选地还包括选自美国专利第5,739,277号的SEQ ID NO:11、1、2和31的序列。

[0352] 在某些实施方案中,Fc结构域或其部分被半糖基化。例如,包含两个Fc区的嵌合蛋白可含有第一糖基化Fc区(例如糖基化CH2区)和第二无糖基化Fc区(例如无糖基化CH2区)。在一个实施方案中,接头可插入在糖基化Fc区与无糖基化Fc区之间。在另一个实施方案中,Fc区被完全糖基化,即所有Fc区均被糖基化。在其他实施方案中,Fc区可为无糖基化的,即没有Fc部分被糖基化。

[0353] 在某些实施方案中,本发明的嵌合蛋白包含对Fc结构域或其部分的氨基酸取代(例如Fc变体),其改变Fc结构域的抗原非依赖性效应功能,具体而言改变蛋白质的循环半衰期。

[0354] 当与缺乏这些取代的蛋白质相比时,这些蛋白质展现与FcR的结合增加或降低,并且因此在血清中的半衰期分别增加或降低。预期对FcR的亲合力提高的Fc变体会具有较长血清半衰期,并且这些分子适合应用于治疗哺乳动物的方法(其中需要施用的多肽的半衰期较长,例如以治疗慢性疾病或病症)中(参见例如美国专利7,348,004、7,404,956和7,862,820)。相反,预期FcR结合亲合力降低的Fc变体会具有较短半衰期,并且此类分子也例

如适用于向哺乳动物施用,其中缩短循环时间可为有利的,例如适用于体内诊断成像或起始多肽当持续延长时期存在于循环中时具有毒性副作用的情形下。FcRn结合亲和力降低的Fc变体也不太可能跨越胎盘,并且因此也适用于治疗怀孕妇女的疾病或病症。此外,可能需要FcRn结合亲和力降低的其他应用包括需要定位于脑、肾和/或肝的那些应用。在一个示例性实施方案中,本发明的嵌合蛋白展现出从血管结构跨越肾小球上皮的转运降低。在另一个实施方案中,本发明的嵌合蛋白展现出从脑跨越血脑屏障(BBB)进入血管间隙中的转运降低。在一个实施方案中,FcR结合改变的蛋白质包含至少一个在Ig恒定区的“FcR结合环”内具有一个或多个氨基酸取代的Fc区(例如一个或两个Fc区)。在一个实施方案中,FcR结合环包含野生型全长Fc区的氨基酸残基280-299(根据EU编号)。在其他实施方案中,本发明嵌合蛋白中的具有改变的FcR结合亲和力的Ig恒定区或其部分包含至少一个在15 Å FcR“接触区”内具有一个或多个氨基酸取代的Fc区。如本文所用,术语15 Å FcRn“接触区”包括野生型全长Fc部分的以下位置处的残基:243-261、275-280、282-293、302-319、336-348、367、369、372-389、391、393、408、424、425-440(EU编号)。在其他实施方案中,本发明的具有改变的FcR结合亲和力的Fc结构域或其部分包含至少一个在对应于任一以下EU位置的氨基酸位置处具有一个或多个氨基酸取代的Fc区:256、277-281、283-288、303-309、313、338、342、376、381、384、385、387、434(例如N434A或N434K)和438。改变FcR结合活性的示例性氨基酸取代公开于国际PCT公开第W005/047327号中,所述公开以引用的方式并入本文中。

[0355] 本发明中使用的Fc区也可包含本领域认可的改变嵌合蛋白的糖基化的氨基酸取代。例如,嵌合蛋白的连接至FVIII蛋白的Fc区可包含具有导致糖基化(例如N-连接或O-连接糖基化)降低的突变的Fc区,或可包含野生型Fc部分的改变的糖形(例如低海藻糖(fucose)或无海藻糖聚糖)。

[0356] 在一个实施方案中,本发明的未加工嵌合蛋白可包含遗传学融合的Fc区(即scFc区),所述Fc区具有二个或更多个独立地选自本文所述的Ig恒定区或其部分的其组成型Ig恒定区或其部分。在一个实施方案中,二聚Fc区的Fc区为相同的。在另一个实施方案中,至少两个Fc区为不同的。例如,本发明蛋白质的Fc区包含相同数目的氨基酸残基,或它们可在长度方面相差一个或多个氨基酸残基(例如约5个氨基酸残基(例如1、2、3、4或5个氨基酸残基)、约10个残基、约15个残基、约20个残基、约30个残基、约40个残基或约50个残基)。在其他实施方案中,本发明蛋白质的Fc区可在序列方面在一个或多个氨基酸位置处不同。例如,至少两个Fc区可在约5个氨基酸位置(例如1、2、3、4或5个氨基酸位置)、约10个位置、约15个位置、约20个位置、约30个位置、约40个位置、或约50个位置处不同。

[0357] 在一些实施方案中,本公开的方法中使用的嵌合蛋白包含多于一条多肽链。在一些实施方案中,嵌合蛋白包含两条多肽链。在某些实施方案中,第一多肽链包含凝血因子和第一Fc区,并且第二多肽链包含第二Fc区。在某些实施方案中,第一Fc区和第二Fc区通过共价键缔合。在一个实施方案中,第一Fc区和第二Fc区通过肽键缔合。在另一个实施方案中,第一Fc区和第二Fc区通过二硫键缔合。

[0358] 在一个特定实施方案中,嵌合蛋白包含因子VIII部分和冯·维勒布兰德因子(VWF)部分,其中所述FVIII部分包含FVIII多肽或其片段,其中所述VWF部分包含VWF多肽或其片段,其中所述FVIII部分连接至第一Fc区,其中所述VWF部分连接至第二Fc区,并且其中

所述第一Fc区和所述第二Fc区彼此缔合。在某些实施方案中,VWF部分包含VWF的D'结构域和D3结构域。在一个实施方案中,第一多肽、第二多肽或第一多肽和第二多肽两者还包含一个或多个半衰期延长部分。

[0359] 本公开的方法中使用的用于产生嵌合蛋白的Fc区或其部分可从许多不同来源获得。在一些实施方案中,Fc区或其部分源于人类Ig。然而,应了解Fc区或其部分可源于另一哺乳动物物种的Ig,所述物种包括例如啮齿动物(例如小鼠、大鼠、兔、豚鼠)或非人类灵长类动物(例如黑猩猩、猕猴)物种。此外,Fc区或其部分可源于任何Ig类别(包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE)和任何Ig同种型(包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。在一个实施方案中,使用人类同种型IgG1。

[0360] 多种Fc区基因序列(例如人类Fc基因序列)可以公开可得的保藏物形式获得。可选择具有特定效应功能(或缺乏特定效应功能)或具有用以降低免疫原性的特定修饰的Fc序列。许多抗体和抗体编码基因序列已经公开并且可使用本领域认可的技术从这些序列获得适合Fc区序列。使用任一前述方法获得的遗传物质可然后被改变或合成以获得本公开的方法中使用的嵌合蛋白。应进一步了解本发明的范围涵盖恒定区DNA序列的等位基因、变体和突变。

[0361] Fc或其部分的序列可例如使用被选择用于扩增相关结构域的聚合酶链反应和引物来克隆。为了从抗体克隆Fc区或其部分的序列,可从杂交瘤、脾或淋巴细胞分离mRNA,将其逆转录成DNA,并且通过PCR扩增抗体基因。PCR扩增方法详述于美国专利第4,683,195号;第4,683,202号;第4,800,159号;第4,965,188号中;以及例如“PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications”Innis等编,Academic Press,San Diego,CA(1990);Ho等1989.Gene 77:51;Horton等1993.Methods Enzymol.217:270中。PCR可通过共同恒定区引物或通过基于公开的重链和轻链DNA和氨基酸序列的更特异性引物来起始。如上所讨论,PCR也可用于分离编码抗体轻链和重链的DNA克隆。在此情况下,可通过共同引物或较大同源探针(诸如小鼠恒定区探针)来筛选文库。适用于扩增抗体基因的众多引物组为本领域中已知的,例如基于纯化抗体的N末端序列(Benhar和Pastan.1994.Protein Engineering 7:1509);cDNA末端的快速扩增物(Ruberti,F.等1994.J.Immunol.Methods 173:33);抗体前导序列(Larrick等1989 Biochem.Biophys.Res.Commun.160:1250)的5'引物。抗体序列的克隆进一步描述于Newman等,1995年1月25日提交的美国专利第5,658,570号中,所述专利以引用的方式并入本文中。

[0362] II.B.半衰期延长部分

[0363] 在一些实施方案中,本公开的方法中使用的嵌合蛋白还包含一个或多个半衰期延长部分。凝血因子的半衰期可通过本领域技术人员已知的任何方法来确定,例如检测血浆FVIII活性水平的FVIII活性分析(显色分析或一级凝血aPTT分析)或检测血浆FVIII抗原水平的FVIII ELISA。在一个特定实施方案中,凝血因子的凝血活性的半衰期通过一级凝血分析确定。在一个更特定实施方案中,在小鼠(HemA小鼠或FVIII和冯·维勒布兰德因子双重敲除(DKO)小鼠)中确定凝血因子的凝血活性的半衰期。

[0364] 在某些方面中,使本发明的凝血因子的半衰期增加的异源部分包括但不限于异源多肽诸如白蛋白、免疫球蛋白Fc区、XTEN序列、人类绒毛膜促性腺素的β亚基的C末端肽(CTP)、PAS序列、HAP序列、转铁蛋白、白蛋白结合部分或这些多肽的任何片段、衍生物、变体

或组合。在其他相关方面中,半衰期延长部分可包含诸如聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、聚唾液酸或这些部分的任何衍生物、变体或组合的非多肽部分的连接位点。在某些实施方案中,所述半衰期延长部分包含白蛋白或其片段、白蛋白结合部分、PAS序列、HAP序列、转铁蛋白或其片段、聚乙二醇(PEG)、聚唾液酸、羟乙基淀粉(HES)、其衍生物或其任何组合。在一些实施方案中,半衰期延长部分不包含XTEN。在其他实施方案中,半衰期延长部分包含XTEN。

[0365] 在其他实施方案中,本发明的嵌合蛋白与一种或多种聚合物缀合。聚合物可为水溶性的或非水溶性的。聚合物可共价或非共价连接至凝血因子、Fc或与凝血因子或Fc缀合的其他部分。聚合物的非限制性实例可为聚(环氧烷)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚恶唑啉或聚(丙烯酰基吗啉)。其他类型的例如聚合物缀合FVIII公开于美国专利第7,199,223号中,所述专利以全文引用的方式加以公开。

[0366] 在某些方面中,本发明的嵌合蛋白可包含一个、两个、三个或更多个各自可为相同分子或不同分子的半衰期延长部分。

[0367] 在一些实施方案中,半衰期延长部分融合至嵌合蛋白的N末端或C末端。在一些实施方案中,半衰期延长部分融合至凝血因子的N末端或C末端。在一些实施方案中,半衰期延长部分融合至Fc的N末端或C末端。在某些实施方案中,半衰期延长部分插入在嵌合蛋白的凝血因子内。

[0368] 在一些实施方案中,嵌合蛋白包含FVIII或其部分,并且半衰期延长部分插入在美国专利公开第2015-0158929 A1号和/或国际公开第WO 2015106052 A1号中所公开的FVIII的一个或多个位置处,所述公开以全文引用的方式并入本文中。在一个特定实施方案中,半衰期延长部分插入在FVIII的B结构域(或其片段)内。在一个特定实施方案中,半衰期延长部分插入在FVIII内紧靠成熟FVIII的氨基酸残基745的下游。

[0369] II.B.1. 白蛋白

[0370] 在某些方面中,本公开的方法中使用的嵌合蛋白包含至少一种白蛋白多肽或其片段、变体或衍生物。人血清白蛋白(HAS或HA)为呈全长形式的具有609个氨基酸的蛋白质,其负责显著比例的血清渗透压并且还充当内源性和外源性配体的载体。如本文所用的术语“白蛋白”包括全长白蛋白或其功能性片段、变体、衍生物或类似物。白蛋白或其片段或变体的实例公开于美国专利公开第2008/0194481A1号、第2008/0004206 A1号、第2008/0161243 A1号、第2008/0261877 A1号或第2008/0153751 A1号或PCT申请公开第2008/033413 A2号、第2009/058322 A1号或第2007/021494 A2号中,所述公开以全文引用的方式并入本文中。

[0371] 白蛋白结合多肽(ABP)可包括但不限于可结合白蛋白的细菌白蛋白结合结构域、白蛋白结合肽或白蛋白结合抗体片段。如Kraulis等,FEBS Lett. 378:190-194(1996)和Linhult等,Protein Sci. 11:206-213(2002)所公开,来自链球菌蛋白G的结构域3为细菌白蛋白结合结构域的实例。白蛋白结合肽的实例公开于Dennis等,J. Biol. Chem. 2002, 277: 35035-35043(2002)。白蛋白结合抗体片段的实例公开于Muller和Kontermann, Curr. Opin. Mol. Ther. 9:319-326(2007);Roovers等,Cancer Immunol. Immunother. 56: 303-317(2007);以及Holt等,Prot. Eng. Design Sci., 21:283-288(2008)中,所述参考文献以全文引用的方式并入本文中。

[0372] 在某些方面中,本公开的方法中使用的嵌合蛋白包含可结合白蛋白的非多肽小分

子、其变体或衍生物的至少一个连接位点。例如，嵌合蛋白可包含一个或多个有机白蛋白结合部分。此类白蛋白结合部分的实例为如由Trussel等, *Bioconjugate Chem.* 20:2286-2292 (2009) 公开的2-(3-顺丁烯二酰亚氨基丙酰氨基)-6-(4-(4-碘苯基)丁酰氨基)己酸酯 (“Albu” 标签)。

[0373] II.B.2.XTEN

[0374] 在某些方面中，本公开的方法中使用的嵌合蛋白包括至少一种XTEN多肽或其片段、变体或衍生物。如此处所用，“XTEN序列”是指具有非天然存在、实质上非重复、主要包含小亲水性氨基酸的序列的长度延长的多肽，所述序列在生理条件下具有较低程度的二级或三级结构或无二级或三级结构。作为嵌合蛋白配偶体，XTEN可充当载体，从而例如当与嵌合蛋白的凝血因子融合或插入至所述凝血因子中时，赋予某些希望的药物动力学、物理化学和药物性质。所述希望的性质包括但不限于增强的药物动力学参数和可溶性特征。

[0375] 与本公开的方法中使用的嵌合蛋白的凝血因子融合或插入至所述凝血因子中的XTEN序列可赋予嵌合蛋白一种或多种以下有利性质：构形可挠性、增强的水溶性、高蛋白酶抗性、低免疫原性、与哺乳动物受体的低结合作用或增加的流体动力学（或斯托克斯 (Stokes)）半径。在某些方面中，XTEN序列可增加药物动力学性质，诸如较长的半衰期（例如，体内半衰期）或增加的曲线下面积 (AUC)，以使嵌合蛋白与无XTEN的嵌合蛋白相比停留在体内并且具有促凝血活性持续增加的时段。

[0376] 可插入至本发明的重组FVIII蛋白中的XTEN序列的实例公开于例如美国专利公开第2010/0239554 A1号、第2010/0323956 A1号、第2011/0046060 A1号、第2011/0046061 A1号、第2011/0077199 A1号或第2011/0172146 A1号，或国际专利公开第WO 2010091122 A1号、第WO 2010144502 A2号、第WO 2010144508 A1号、第WO 2011028228 A1号、第WO 2011028229 A1号、第WO 2011028344 A2号或第WO 2015106052 A1号中，所述公开各自以全文引用的方式并入本文中。

[0377] II.B.3.VWF或其片段

[0378] 在某些方面中，本公开的方法中使用的嵌合蛋白包括至少一种VWF多肽或其片段、变体或衍生物。VWF（也称为F8VWF）为一种存在于血浆中并且在内皮（在怀布尔-帕拉德体 (Weibel-Palade body) 中）、巨核细胞（血小板的 α -颗粒）和内皮下结缔组织中组成性产生的大型多聚糖蛋白。基本VWF单体为2813个氨基酸的蛋白质。每个单体含有多个具有特定功能的特异性结构域，即D[']/D3结构域（其结合因子VIII）、A1结构域（其结合血小板GPIb受体、肝素和/或可能的胶原蛋白）、A3结构域（其结合胶原蛋白）、C1域（其中RGD结构域在此结构域活化时结合血小板整合蛋白 α IIb β 3）、以及在蛋白质的C末端的“半胱氨酸结 (cysteine knot)”结构域（所述VWF与血小板源性生长因子 (PDGF)、转化生长因子- β (TGF β) 和 β -人类绒毛膜促性腺素 (hCG) 共有所述结构域)。

[0379] 在一个实施方案中，VWF多肽为VWF片段。如本文所用的术语“VWF片段”包括但不限于能够抑制内源性VWF与FVIII结合的包含D[']结构域和D3结构域的功能性VWF片段。在一个实施方案中，本公开的方法中使用的嵌合蛋白包含凝血因子、Fc区和VWF片段，其中所述凝血因子包含FVIII，并且其中所述VWF片段结合FVIII蛋白。在另一个实施方案中，VWF片段阻断FVIII蛋白上的VWF结合位点，从而抑制FVIII蛋白与内源性VWF的相互作用。VWF片段包括保留VWF的这些活性的衍生物、变体、突变体或类似物。在某些实施方案中，VWF片段包含VWF

的D'结构域和D3结构域。

[0380] 人类VWF的2813单体氨基酸序列在基因库中报导为登录号NP_000543.2。编码人类VWF的核苷酸序列在基因库中报导为登录号NM_000552.3。

[0381] 在某些实施方案中,本文中有用的VWF蛋白可进一步被修饰以改善其与FVIII的相互作用,例如改善对FVIII的结合亲和力。在其他实施方案中,适用于本发明的VWF蛋白可具有其他修饰,例如蛋白质可被聚乙二醇化、糖基化、羟乙基淀粉化或聚唾液酸化。适用于本公开的方法中的示例性VWF序列提供于例如美国公开第US 2015/0023959 A1号、第US 2015/0266943 A1号和第US 2015/0158929号中。在某些实施方案中,VWF蛋白或其片段融合至FcRn结合配偶体或与FcRn结合配偶体共同施用。在一些实施方案中,VWF蛋白或其片段融合至Fc或与Fc或包含Fc的多肽共同施用。在一些实施方案中,VWF蛋白或其片段融合至白蛋白或与白蛋白或包含白蛋白的多肽共同施用。

[0382] II.B.4.CTP

[0383] 在某些方面中,本公开的方法中使用的嵌合蛋白包含人类绒毛膜促性腺素的β亚基的至少一个C末端肽(CTP)或其片段、变体或衍生物。已知CTP肽增加所述蛋白质的半衰期。参见例如美国专利第5,712,122号,其以全文引用的方式并入本文中。非限制性示例性CTP肽公开于美国专利申请公开第US 2009/0087411 A1号中,其以引用方式并入。

[0384] II.B.5.PAS

[0385] 在某些方面中,本公开的方法中使用的嵌合蛋白包含至少一种PAS肽或其片段、变体或衍生物。如本文所用的PAS肽或PAS序列意指主要包含丙氨酸和丝氨酸残基或主要包含丙氨酸、丝氨酸和脯氨酸残基的氨基酸序列,所述氨基酸序列在生理条件下形成无规卷曲构形。因此,PAS序列为包含丙氨酸、丝氨酸和脯氨酸、基本上由这些氨基酸组成、或由这些氨基酸组成的可用作嵌合蛋白中异源部分的一部分的构建嵌段、氨基酸聚合物或序列盒。当将除丙氨酸、丝氨酸和脯氨酸以外的残基作为次要组分添加于PAS序列中时,氨基酸聚合物也可形成无规卷曲构形。“次要组分”意指除丙氨酸、丝氨酸和脯氨酸以外的氨基酸可在某种程度上添加于PAS序列中,例如氨基酸的至多约12%,即PAS序列的100个氨基酸中有约12个那些氨基酸、至多约10%、至多约9%、至多约8%、约6%、约5%、约4%、约3%,即约2%或约1%。不同于丙氨酸、丝氨酸和脯氨酸的氨基酸可选自由以下组成的组:Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr和Val。在生理条件下,PAS肽形成无规卷曲构形并且因此可介导本发明重组蛋白的体内和/或体外稳定性增强,并且具有促凝血活性。

[0386] PAS肽的非限制性实例公开于例如美国专利公开第2010/0292130 A1号;PCT申请公开第W0 2008/155134 A1号;以及欧洲颁布专利EP2173890。

[0387] II.B.6.HAP

[0388] 在某些方面中,本公开的方法中使用的嵌合蛋白包含至少一种均聚氨基酸聚合物(HAP)肽或其片段、变体或衍生物。HAP肽可包含甘氨酸重复序列,其长度为至少50个氨基酸、至少100个氨基酸、120个氨基酸、140个氨基酸、160个氨基酸、180个氨基酸、200个氨基酸、250个氨基酸、300个氨基酸、350个氨基酸、400个氨基酸、450个氨基酸或500个氨基酸。HAP序列能够延长融合于或连接至HAP序列的部分的半衰期。HAP序列的非限制性实例包括但不限于(Gly)_n、(Gly₄Ser)_n或S(Gly₄Ser)_n,其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、

15、16、17、18、19或20。在一个实施方案中，n为20、21、22、23、24、25、26、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40。在另一个实施方案中，n为50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200。参见例如Schlapschy M等, *Protein Eng. Design Selection*, 20:273-284 (2007)。

[0389] II.B.7. 转铁蛋白

[0390] 在某些方面中，本公开的方法中使用的嵌合蛋白包含至少一种转铁蛋白肽或其片段、变体或衍生物。任何转铁蛋白均可与本公开的方法中使用的嵌合蛋白融合。举例而言，野生型人类Tf (Tf) 为大致75kDa (不考虑糖基化) 的679个氨基酸的蛋白质，具有似乎由基因复制产生的两个主要结构域N (约330个氨基酸) 和C (约340个氨基酸)。参见基因库登录号NM001063、XM002793、M12530、XM039845、XM 039847和S95936 (www.ncbi.nlm.nih.gov)，其全部以全文引用的方式并入本文中。

[0391] 转铁蛋白通过转铁蛋白受体 (TfR) 介导的胞吞作用来转运铁。在铁释放至内体区室 (endosomal compartment) 中并且Tf-TfR复合物再循环至细胞表面之后，Tf释放回细胞外空间以进行下一个铁转运循环。Tf具有超过14-17日的长半衰期 (Li等, *Trends Pharmacol. Sci.* 23:206-209 (2002))。已对转铁蛋白融合蛋白的半衰期延长进行研究，靶向以用于癌症治疗的递送、经口递送和胰岛素原的持续活化 (Brandsma等, *Biotechnol. Adv.*, 29:230-238 (2011); Bai等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:7292-7296 (2005); Kim等, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 334:682-692 (2010); Wang等, *J. Controlled Release* 155:386-392 (2011))。

[0392] II.B.8. PEG

[0393] 在某些方面中，本公开的方法中使用的嵌合蛋白包含非多肽异源部分或其片段、变体或衍生物的至少一个连接位点。例如，本公开的方法中使用的嵌合蛋白可包含连接至凝血因子和/或Fc区中一个或多个氨基酸残基的一个或多个聚乙二醇 (PEG) 部分。

[0394] 蛋白质的聚乙二醇化可以是指在蛋白质与至少一个聚乙二醇 (PEG) 分子之间形成缀合物。可购得在多种分子量和平均分子量范围内的PEG。PEG平均分子量范围的典型实例包括但不限于约200、约300、约400、约600、约1000、约1300-1600、约1450、约2000、约3000、约3000-3750、约3350、约3000-7000、约3500-4500、约5000-7000、约7000-9000、约8000、约10000、约8500-11500、约16000-24000、约35000、约40000、约60000和约80000道尔顿。这些平均分子量仅作为实例提供并且不意图以任何方式具有限制性。

[0395] 本公开的方法中使用的嵌合蛋白可被聚乙二醇化以包含单个或多个 (例如，2-4个) PEG部分。聚乙二醇化可通过本领域中已知的任一种聚乙二醇化反应进行。用于制备聚乙二醇化蛋白质产物的方法一般将包括 (i) 使多肽与聚乙二醇 (诸如PEG的反应性酯或醛衍生物) 在使本发明的肽连接至一个或多个PEG基团的条件下反应；以及 (ii) 获得反应产物。一般而言，反应的最佳反应条件将基于已知参数和所需结果根据具体情况来确定。

[0396] 存在许多本领域技术人员可利用的PEG连接方法，例如Malik F等, *Exp. Hematol.* 20:1028-35 (1992); Francis, *Focus on Growth Factors* 3(2):4-10 (1992); 欧洲专利公开第EP0401384号、第EP0154316号和第EP0401384号；以及国际专利申请公开第W092/16221号和第W095/34326号。作为非限制性实例，FVIII变体可含有半胱氨酸取代，并且半胱氨酸可进一步缀合至PEG聚合物。参见Mei等, *Blood* 116:270-279 (2010) 和美国专利

第7,632,921号,其以全文引用的方式并入本文中。

[0397] II.B.9.HES

[0398] 在某些方面中,本公开的方法中使用的嵌合蛋白包含至少一种羟乙基淀粉(HES)聚合物。HES为天然存在的支链淀粉的衍生物并且由体内的 α -淀粉酶降解。HES展现出有利生物性质并且在临床上用作血容量置换剂并用于血液稀释疗法中。参见例如Sommermeyer等,Krankenhauspharmazie 8:271-278(1987);以及Weidler等,Arzneim.-Forschung/Drug Res. 41:494-498(1991)。

[0399] HES主要通过分子量分布和取代度来表征。HES的平均分子量(重均分子量)为1至300kD、2至200kD、3至100kD或4至70kD。对于羟乙基,羟乙基淀粉可进一步展现出0.1至3、0.1至2、0.1至0.9或0.1至0.8的摩尔取代度,以及2至20范围内的C2:C6取代比率。平均分子量为约130kD的HES为来自Fresenius的VOLUVEN®。VOLUVEN®为一种例如用于容量置换的人工胶体,所述容量置换用于低血容量症(hypovolaemia)的治疗和预防的治疗适应症中。存在许多本领域技术人员可利用的HES连接方法,例如上述相同PEG连接方法。

[0400] II.B.10.PSA

[0401] 在某些方面中,本公开的方法中使用的嵌合蛋白包含至少一种聚唾液酸(PSA)聚合物。PSA为由某些细菌菌株和在哺乳动物的某些细胞中产生的唾液酸的天然存在的未分支聚合物。参见例如Roth J.等,(1993),Polysialic Acid:From Microbes to Man,Roth J.,Rutishauser U.,Troy F.A.编(Birkhäuser Verlag,Basel,Switzerland),第335-348页。PSA可通过有限酸水解或通过用神经氨酸苷酶(neuraminidase)消化或通过分离天然细菌源性形式的聚合物来以从 n = 约80个或80个以上唾液酸残基至 n = 2的各种聚合度产生。存在许多本领域技术人员可利用的PSA连接方法,例如上述相同PEG连接方法。在某些方面中,活化PSA也可连接至凝血因子内(例如,FVIII上)或Fc区内的半胱氨酸氨基酸残基。参见例如美国专利第5846951号。

[0402] II.B.11.清除受体

[0403] 在某些方面中,本公开的方法中使用的嵌合蛋白的半衰期可延长,其中所述嵌合蛋白的凝血因子包含FVIII和FVIII清除受体的至少一个片段、或其FVIII结合片段、变体或衍生物。插入诸如低密度脂蛋白相关蛋白受体LRP1的清除受体或其片段的可溶形式可阻断FVIII与清除受体的结合并且从而延长其半衰期,例如体内半衰期。LRP1为一种参与多种蛋白质(包括FVIII)的由受体介导的清除中的600kDa完整膜蛋白。参见例如Lenting等,Haemophilia 16:6-16(2010)。其他合适的FVIII清除受体为例如LDLR(低密度脂蛋白受体)、VLDLR(极低密度脂蛋白受体)和巨蛋白(megalin)(LRP-2)或其片段。参见例如Bovenschen等,Blood 106:906-912(2005);Bovenschen,Blood 116:5439-5440(2010);Martinelli等,Blood 116:5688-5697(2010)。

[0404] III.多核苷酸、载体和宿主细胞

[0405] 在一些方面中,本公开提供一种人类的免疫耐受性的方法,其包括向所述人类施用有效量的编码凝血因子和/或Fc区(例如,编码包含凝血因子和Fc区的嵌合蛋白)的多核苷酸或多核苷酸组,其中所述人类无法响应于一种或多种先前免疫耐受性疗法。在一些实施方案中,所述多核苷酸或所述多核苷酸组是处于表达载体或表达载体组内。在某些实施方案中,表达载体或表达载体组是处于一个或多个宿主细胞内。

[0406] 本公开的方法中使用的编码凝血因子和/或Fc区(例如,编码包含凝血因子和Fc区的嵌合蛋白)的多核苷酸可为单个核苷酸序列、两个核苷酸序列、三个核苷酸序列或更多个核苷酸序列。在一个实施方案中,单个核苷酸序列编码包含凝血因子(例如,FVIII多肽)和Fc区的嵌合蛋白。在另一个实施方案中,多核苷酸包含两个核苷酸序列,第一核苷酸序列编码凝血因子(例如,FVIII)并且第二核苷酸序列编码Fc区。在另一个实施方案中,多核苷酸包含两个核苷酸序列,第一核苷酸序列编码凝血因子(例如,FVIII)和Fc区并且第二核苷酸序列编码第二Fc区。在某些实施方案中,编码的Fc结构域在表达后形成共价键。

[0407] 在一些实施方案中,多核苷酸为密码子优化的。

[0408] 如本文所用,表达载体是指含有在引入适当宿主细胞中时插入的编码序列转录和翻译所必需的元件,或在RNA病毒载体的情况下复制和翻译所必需的元件的任何核酸构建体。表达载体可包括质粒、噬菌粒、病毒及其衍生物。

[0409] 如本文所用的基因表达控制序列为有助于与其可操作地连接的编码核酸的高效转录和翻译的任何调控性核苷酸序列,诸如启动子序列或启动子-增强子组合。基因表达控制序列可例如为哺乳动物或病毒启动子,诸如组成性或诱导性启动子。组成性哺乳动物启动子包括但不限于以下基因的启动子:次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)、腺苷脱氨酶、丙酮酸激酶、 β -肌动蛋白启动子以及其他组成性启动子。在真核细胞中组成性起作用的示例性病毒启动子包括例如来自巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒(例如SV40)、乳头瘤病毒、腺病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)、巨细胞病毒、莫罗尼白血病病毒(Moloney leukemia virus)的长末端重复序列(LTR)以及其他反转录病毒的启动子、和单纯性疱疹病毒的胸苷激酶启动子。本领域普通技术人员已知其他组成性启动子。适用作本发明的基因表达序列的启动子还包括诱导性启动子。诱导性启动子在诱导剂存在下表达。例如,诱导金属硫蛋白启动子以促进在某些金属离子存在下的转录和翻译。其他诱导性启动子为本领域普通技术人员所已知。

[0410] 出于本发明的目的,可采用众多表达载体系统。这些表达载体通常在宿主生物体中可作为游离体或作为宿主染色体DNA的整体部分复制。表达载体可包括表达控制序列,包括但不限于启动子(例如天然缔合或异源启动子)、增强子、信号序列、剪接信号、增强子元件和转录终止序列。优选的是,表达控制序列为在能够转化或转染真核宿主细胞的载体中的真核启动子系统。表达载体也可利用来源于动物病毒,诸如牛乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录病毒(RSV、MMTV或MOMLV)、巨细胞病毒(CMV)或SV40病毒的DNA元件。其他表达载体涉及使用具有内部核糖体结合位点的多顺反子系统。

[0411] 通常,表达载体含有选择标记物(例如氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性 or 新霉素抗性)以允许检测被所需DNA序列转化的那些细胞(参见例如Itakura等,美国专利第4,704,362号)。将DNA整合至染色体中的细胞可通过引入一个或多个允许选择转染宿主细胞的标记物来进行选择。标记物可向具有生物杀灭剂抗性(例如抗生素)或对诸如铜的重金属具有抗性的营养缺陷型宿主提供原营养。可选择标记物基因可直接连接至待表达的DNA序列,或通过共转化引入同一细胞中。

[0412] 适用于优化表达本公开的方法中使用的嵌合蛋白的载体的实例为NEOSPLA(美国专利第6,159,730号)。此载体含有巨细胞病毒启动子/增强子、小鼠 β 球蛋白主要启动子、SV40复制起点、牛生长激素聚腺苷酸化序列、新霉素磷酸转移酶外显子1和外显子2、二氢叶

酸还原酶基因和前导序列。已发现,此载体在并入可变区和恒定区基因中、在细胞中转染随后在含G418的培养基中选择并进行甲氨喋呤扩增后以极高水平表达抗体。载体系统也教授于美国专利第5,736,137号和第5,658,570号中,所述专利各自以全文引用的方式并入本文中。此系统提供高表达水平,例如>30pg/细胞/日。其他示例性载体系统公开于例如美国专利第6,413,777号中。

[0413] 在其他实施方案中,本发明的多肽使用多顺反子构建体表达。在这些表达系统中,可从单个多顺反子构建体产生多个相关基因产物,诸如多聚体结合蛋白质的多个多肽。这些系统有利地使用内部核糖体入口位点(IRES)以在真核宿主细胞中提供相对较高水平的多肽。相容性IRES序列公开于美国专利第6,193,980号,所述专利也并入本文中。

[0414] 更一般而言,一旦制备出编码多肽的载体或DNA序列,即可将所述表达载体引入适当宿主细胞中。即,可转化宿主细胞。将质粒引入宿主细胞中可通过如上文所讨论的本领域技术人员熟知的各种技术实现。转化的细胞在适于产生嵌合蛋白的条件下生长,并且针对嵌合蛋白合成进行分析。示例性分析技术包括酶联免疫吸附剂分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)或荧光活化细胞分选器分析(FACS)、免疫组织化学及其类似技术。

[0415] 现已详细描述本发明,通过参考以下实施例将更明确地了解本发明,所述实施例为仅出于说明目的包括于此并且不意图限制本发明。

[0416] 实施例

[0417] 实施例1

[0418] A型血友病(“因子VIII[FVIII]缺乏症”)为一种罕见的出血病症并且为最常见类型的血友病。患有A型血友病的患者的最严重得多治疗并发症为产生对FVIII的抑制性IgG抗体。抑制剂导致输注FVIII快速清除和功效显著减小或无功效。FVIII抑制剂绕过剂用于治疗具有抑制剂的患者的急性出血,但抑制剂根除才是长期管理的目标。

[0419] 通过频繁施用高剂量FVIII进行的免疫耐受性诱导(“ITI”)疗法为已显示实现抗原特异性耐受性的唯一策略。ITI通常试图消除高反应FVIII抑制剂(≥ 5 BU效价)。若干研究已研究不同FVIII产品在以不同剂量和注射频率实现成功ITI中的功效,在临床实践中已经发布国际共识建议以支持ITI方法。在国际ITI研究中,高剂量组(“HD”) (200IU/Kg/日)的患者实现阴性效价和正常恢复率,所述恢复率比低剂量组(“LD”)的患者显著更快。Hay和DiMichele, Blood 119(6):1335-44(2012)。HD患者也经历比LD患者显著更少的出血,并且出于此原因,数据安全监测委员会(data safety monitoring board, “DSMB”)建议终止研究,因为他们将出血识别为安全问题。高剂量200IU/Kg/日为“高风险”患者(定义为峰值历史效价>200BU、ITI前效价>10BU和/或从抑制剂诊断以来>5年的患者)的建议剂量。研究延长半衰期(“EHL”) rFVIIIIFc在ITI中的兴趣逐渐增加。rFVIIIIFc已在2014年在美国以名称ELOCTATE®并且在2015年在欧洲以名称ELOCTA®批准。

[0420] rFVIIIIFc为在人类细胞系(“HEK293”)中以融合至人类IgG的Fc结构域的重组B结构域缺失(“BDD”)因子VIII形式产生。HEK产生的蛋白质具有与原生人类蛋白质类似的翻译后修饰,与来自其他物种的细胞系(例如,CHO细胞)中产生的蛋白质不同。在此类蛋白质中,由翻译后修饰产生的非人类聚糖(诸如N-羟乙酰基神经氨酸(NGNA)和半乳糖- α -1,3-半乳糖(α -Gal))可具有潜在免疫原性。NGNA和 α -Gal均不存在于rFVIIIIFc中。小鼠模型已显示rFVIIIIFc诱导对FVIII的调控性T细胞反应(参见Batsuli Hemophilia (2016), 22(增刊5),

31-35), 这向一些研究者表明rFVIIIFc可提供比rFVIII更有效的ITI, 具体而言为缩短的ITI。

[0421] 目标

[0422] 本研究的主要目标是描述在ITI治疗之后患者使用rFVIIIFc的耐受性时间。研究目的也在于描述ITI治疗的结果; 描述用rFVIIIFc执行的成功ITI之后一段时间内的复发率; 描述ITI期间和用rFVIIIFc执行的成功ITI之后时间段期间的间发出血; 描述当用于ITI时rFVIIIFc的安全性和可耐受性; 描述具体生活质量(QoL)问题; 并且显示rFVIIIFc消耗。

[0423] 实施例2

[0424] 本研究目的在于描述在先前ITI疗法失败的具有抑制剂的患有重度A型血友病的患者中rFVIIIFc对于ITI的使用。具体而言, 此研究的主要目标为描述先前耐受作用的尝试(包括使用免疫抑制剂)失败的患者中用rFVIIIFc执行的ITI治疗在ITI治疗之后的结果。次级目标及其终点包括: (1) 描述在先前免疫耐受作用的尝试(包括使用免疫抑制剂)失败的患者中用rFVIIIFc执行的ITI的耐受作用时间, 终点为ITI成功时间; (2) 描述用rFVIIIFc执行的成功ITI之后的复发率, 终点为复发的发生; (3) 描述在ITI期间和在用rFVIIIFc执行的成功ITI之后的时间段期间之间发出血, 终点为出血率; (4) 描述当用于ITI时rFVIIIFc的安全性和可耐受性, 终点为不良事件和/或注射部位反应; 并且(5) 描述以ELOCTA®执行的ITI中rFVIIIFc的消耗, 终点为rFVIIIFc。

[0425] 实施例3

[0426] 在此研究中, 患有重度A型血友病病具有高效价抑制剂(历史峰值 ≥ 5 个贝塞斯达单位[BU]/mL)的所有年龄的男性受试者将接受重组凝血因子VIII Fc融合蛋白(rFVIIIFc)以供经历第一次免疫耐受性诱导(ITI)疗法, 以根除并中和抗凝血因子VIII(FVIII)同种抗体。

[0427] 参与者将接受剂量为200个国际单位(IU)/千克(kg)的rFVIIIFc, 其根据研究者的判断每日一次注射或分成每日若干次注射, 以基线随访起始至ITI期的最大48周。满足免疫耐受性诱导(ITI)成功标准的参与者将进入减量期, 并且将接受rFVIIIFc(呈供静脉内施用的注射用粉末形式), 其剂量根据研究者判断来调整(50或100IU/kg)从第1周至第6周每日一次并且其后直至第16周每隔一日。

[0428] 此研究的主要结果量度为描述在至多12个月的时间范围期间用rFVIIIFc进行的耐受作用时间。耐受作用被定义为抑制剂效价 < 0.6 BU/mL、FVIII恢复率 $> 66\%$ 和 $t_{1/2} \geq 7$ h。

[0429] 次要结果测量为免疫耐受性诱导(ITI)成功的参与者数目。ITI成功将被定义为: 通过Nijmegen修改的贝塞斯达分析, 抑制剂的阴性效价小于($<$)0.6BU/mL; 在2次连续确定中, FVIII增量恢复率(IR) > 1.3 个国际单位每分升(IU/dL)每IU/kg, 表示66%预期IR 2IU/dL每IU/kg; 半衰期($t_{1/2}$) ≥ 7 小时。ITI成功将在至多48周的时间范围内监测。

[0430] 另一次要结果测量为经历复发的参与者数目。将评估达到复发标准(定义为实现耐性性之后抑制剂效价 > 0.6 BU/mL或恢复率异常)的ITI成功的参与者的百分比。复发将在至多48周的时间范围内监测。

[0431] 另一次要结果测量为出血事件数目。出血事件开始于形成第一出血迹象, 并且结束于最后一次治疗出血之后不多于72小时, 在此期间将位于同一位置的任何出血症状或相距小于或等于72小时的注射被认为是同一出血事件。出血事件将在至多第104周的时间范

围内监测。

[0432] 另一次要结果测量为具有治疗紧急不良事件 (AE) 和治疗紧急严重不良事件 (SAE) 的参与者数目。AE为与此治疗不一定具有因果关系的任何不利医疗事件。SAE为以任何剂量发生以下情况的任何不利医疗事件：导致死亡；研究者认为参与者处于死亡的直接风险（威胁生命的事件）；需要住院或住院时间延长；导致永久或重大的能力丧失/无能力；导致先天性异常/出生缺陷；研究者认为可能危害参与者或可能需要介入以预防定义中所列的其他结果之一的任何其他医学上重要的事件。AE和SAE将测量约2年的时间范围。

[0433] 另一次要结果测量为缺班或缺课的天数。缺课或缺班的天数将在直至第104周的时间范围内描述性概述。

[0434] 另一次要结果测量为住院天数。住院天数将在多至第104周的时间范围内描述性概述并监测。

[0435] 另一次要结果测量为对治疗方案的依从性，其定义为施用剂量相对于计划剂量的百分比，并且在多至第104周的时间范围内监测。

[0436] 另一次要结果测量为rFVIIIFc的消耗。消耗将基于施用的研究治疗的量来评定，并且消耗将在多至第104周的时间范围内监测。

[0437] 本研究将涉及诊断为患有重度A型血友病（如根据医疗记录所确认）的任何年龄的男性参与者。受试者将已诊断为具有高效价抑制剂（历史峰值大于或等于（ \geq ）5个生物学单位每毫升（BU/mL），根据医学记录），并且受试者将先前已用任何血浆来源或重组常规或延长半衰期FVIII治疗。排除标准包括患有除A型血友病之外的其他任何凝血病症的受试者；任何先前ITI疗法；与任何重组凝血因子VIII Fc（rFVIIIFc）施用相关联的过敏症或过敏的病史；如当地实验室所评定的任何异常肾功能（血清肌酸酐大于2.0毫克每分升 [mg/dL]）；和/或如通过当地实验室所评定的血清丙氨酸转氨酶或天冬氨酸转氨酶 $>5x$ 正常值上限（ULN）。

[0438] 实施例4

[0439] 在2014年7月1日与2017年6月1日之间在美国和加拿大跨10个地点进行在患有重度A型血友病和具有高效价抑制剂（HTI； $\geq 5BU$ ）的患者中用rFVIIIFc进行的ITI的非介入性回顾性病历回顾。包括了已开始用rFVIIIFc针对ITI的治疗（作为主要疗法或援救疗法，不管是否有反应）、具有HTI、患有重度A型血友病的所有年龄的男性患者。

[0440] 在管理机构批准之后，经由电子问卷调查收集去识别的临床信息。根据较早期列出的标准，第一次经ITI治疗的患者被认为处于ITI失败的高风险。阴性贝塞斯达效价被定义为 $\leq 0.6BU$ 。耐受作用被定义为阴性贝塞斯达效价以及正常FVIII恢复率（ $\geq 66\%$ ）和半衰期（ ≥ 6 小时）。此研究的主要目标是报导使用rFVIIIFc的ITI的临床特征和结果。结果使用描述统计学进行概述；未进行推论统计分析。

[0441] 结果

[0442] 研究群体

[0443] 对十九名患者进行识别。在这些患者中，七名患者第一次接受ITI，并且12名患者经历援救性ITI（表1和2）。在rFVIIIFc ITI开始时的中值年龄对于第一次ITI为1.3岁（范围：0.8-4.3岁）并且对于援救性ITI患者为6.4岁（范围：1.6-12.6岁）。

[0444] 第一次ITI患者具有151BU（范围：11-1126BU）的中值峰值历史抑制剂（ITI前）效

价;在rFVIIIIFc ITI开始时中值抑制剂效价为52BU(范围:3-1126BU)。在ITI开始时,七名第一次ITI患者中六名患者效价>10BU;这六名患者中四名患者效价>50BU。从抑制剂诊断至rFVIIIIFc ITI开始的中值时间为4.4周(范围:0-41周)。

[0445] 对于援救性ITI患者,用其他FVIII产品的先前ITI病程的中值数为2.6(范围:1-5)并且从抑制剂诊断至rFVIIIIFc ITI开始的中值时间为5.5年(范围:0.8-12年)。19名患者中18名患者的FVIII基因型示出于表1和2中。

[0446] 第一次ITI患者结果

[0447] 在数据收集时,经历第一次ITI的七名患者中四名患者(表1)被耐受化并且转变成用rFVIIIIFc预防。这四名患者中三名患者实现阴性贝塞斯达效价以及正常FVIII恢复率和半衰期;因此,他们满足5、7和9个月的耐受作用的标准定义。第四名患者被被认为基于阴性抑制剂效价在14.8个月时由治疗医师耐受化并且转变成预防;在数据收集时,所述患者在完成rFVIIIIFc ITI之后13个月并且他在rFVIIIIFc预防时继续具有阴性抑制剂。此时也报导正常半衰期。

[0448] 表1:第一次接受ITI的患者。

[0449]

患者	基因型	历史峰值抑制剂效价(BU/mL)	rFVIIIIFc ITI前抑制剂效价(BU/mL)	从阳性贝塞斯达效价至ITI开始的时间(周)	rFVIIIIFc ITI方案	当前效价(BU/mL)	阴性贝塞斯达效价的时间(周)	耐受作用时间(周)	当前状态
1	错义	51.7	51.7	10.9	85 IU/kg 每日	<0.6	4	21	rFVIIIIFc 预防
2	读框转移	150.9	106.9	13.0	100 IU/Kg 每日	<0.6	24	29	rFVIIIIFc 预防
3	NR	1126	1126	1.1	200 IU/kg 每日	<0.6	31	38	rFVIIIIFc 预防
4	I-22	11	11	4.4	50 IU/kg 3x/wk	<0.6	64	64	rFVIIIIFc 预防
5	I-22	388	32	41.0	102 IU/kg EOD	18	NA	N/A	rFVIIIIFc ITI
6	I-22	378.7	378.1	1.0	96 IU/kg 每日	23	NA	N/A	rFVIIIIFc ITI
7 ^a	I-22	30	3	0.0	83 IU/kg 每日	16	NA	N/A	rFVIIIIFc ITI

[0450] BU,贝塞斯达单位;EOD,每隔一日;I-22,第22内含子反转;ITI,免疫耐受性诱导;NR,未报导;N/A,不适用;rFVIIIIFc,重组因子VIII Fc融合蛋白。耐受作用时间为基于医师报导、解析的贝塞斯达效价、正常恢复率和半衰期。第4名患者不具有可用的恢复率和半衰期信息,但被医师报导为耐受化并转换成rFVIIIIFc预防。^a接受利妥昔单抗。

[0451] 在四名患者中,获得阴性贝塞斯达效价的中值时间为27.7周(范围:4.1-64周)。四名耐受化患者中三名患者的ITI方案由每日rFVIIIIFc (85-200IU/kg) 组成,与第四名患者的每周三次给药 (50IU/kg) (表1) 相比较。所有四名患者的报导的耐受作用的中值时间为33.9周(7.8个月;范围:21-64周)。对于每日用rFVIIIIFc (85-200IU/kg) 治疗的三名患者,耐受作用需29周(6.7个月;范围:20.6-38周),然而用50IU/kg每周三次治疗的第四名患者在64周(14.8个月)内被耐受化。

[0452] 在剩余患者(n=3)中,两名患者的贝塞斯达效价减小(在ITI的18和58周之后,分别为从32至18BU和从378至23BU)。在此回顾时,一名患者的贝塞斯达效价增加(在ITI的15周之后,从3至16BU);此患者已进行并结束ITI并且根据治疗医师报导具有rFVIIIIFc中断和不良顺应性(表1)。所有七名第一次ITI患者继续rFVIIIIFc ITI或预防。

[0453] 援救性ITI患者结果

[0454] 经历援救性ITI的12名患者(表2)中七名患者起初用rFVIIIIFc ITI实现贝塞斯达阴性。获得阴性效价的中值时间为14.1周(范围:3-67.6周)。这七名患者中三名患者保持贝塞斯达阴性并且继续rFVIIIIFc ITI或rFVIIIIFc脱离而成预防。起初实现阴性效价的另外四名患者稍后产生>0.6BU的效价。在这些患者中,两名患者继续rFVIIIIFc ITI并且两名患者转变成使用其他因子的ITI(表2)。

[0455] 表2:接受援救性ITI的患者。

[0456]

患者	基因型	ITI 治疗之前的数目	历史峰值抑制剂效价 (BU/mL)	rFVIIIIFc ITI 之前的抑制剂效价 (BU/mL)	rFVIIIIFc ITI 方案	当前效价 (BU/mL)	阴性贝塞斯达效价的时间 ^b (周)	当前状态
8	I-22	5	250	9	202 IU/kg 每日	<0.6	28	rFVIIIIFc ITI 脱离
9	I-22	2	67	4	150 IU/kg 每日	<0.6	3	其他 ITI
10	大缺失	2	70	35	200 IU/kg EOD	<0.6	31	rFVIIIIFc ITI
11	I-22	1	178	1	100 IU/kg 3x/wk	<0.6	14	rFVIIIIFc ITI
12 ^a	I-22	2	460	200	150 IU/kg 每日	2	13	其他 ITI
13	I-22	3	41.8	22	130 IU/kg 每日	16	68	rFVIIIIFc ITI

[0457]

14 ^a	无义	2	306	129	100 IU/kg 每日	23	13	rFVIII Fc ITI
15	I-22	1	35	36	200 IU/kg EOD	22	NA	rFVIII Fc ITI
16	I-22	3	11	1	100 IU/kg EOD	0.9	NA	rFVIII Fc ITI
17	I-22	2	8	0.6	115 IU/kg EOD	1.2	NA	rFVIII Fc ITI
18	大缺失	4	1024	237	100 IU/kg 每日	1024	NA	rFVIII Fc ITI
19	无义	4	409	26	100 IU/kg 每日	166	NA	绕过疗法

[0458] BU, 贝塞斯达单位; EOD, 每隔一日; I-22, 第22个内含子反转; ITI, 免疫耐受性诱导; rFVIII Fc, 重组因子VIII Fc融合蛋白; wk, 周。^a接受利妥昔单抗; ^b阴性贝塞斯达效价的时间表示从rFVIII Fc ITI开始至首次报导阴性效价的时间; 当前效价>0.6BU/mL可表示复发。

[0459] 在实现贝塞斯达阴性的七名患者中, 三名患者也在3、14和65周实现正常FVIII恢复率, 并且第四名患者在27周达到正常FVIII半衰期。其他患者中不可获得恢复率和半衰期(表2)。在剩余五名患者中, 一名患者的贝塞斯达效价减小(10周后从36至22BU), 并且四名患者的贝塞斯达效价保持不变或在进行ITI时增加(表2)。在这五名患者中, 四名患者继续rFVIII Fc ITI, 并且一名患者从ITI离开并单独进行绕过疗法。

[0460] 给药结果、绕过剂使用和当前治疗状态

[0461] 此研究中评定的患者群体接受宽范围/定时剂量(表1和2)。在每日施用较高剂量的情况下看到快速朝向阴性抑制剂效价的倾向。接受每日rFVIII Fc剂量 ≥ 130 IU/kg的五名患者(一名接受第一次ITI并且四名接受援救性ITI)中五名患者在中值28周实现阴性贝塞斯达效价。19名患者中十八名患者在rFVIII Fc ITI同时使用绕过剂; 十四名患者主要进行预防(9名用aPCC预防并且5名用rFVIIa预防)并且四名患者按需要用rFVIIa治疗。

[0462] 总而言之, 在数据收集时, 19名患者中16名患者保持进行rFVIII Fc(预防或ITI)(表1和2)。

[0463] 安全性

[0464] 未报导不良事件(包括无血栓栓塞)。执行了六个手术, 所有手术均无rFVIII Fc ITI中断(膝盖滑膜切除术、颅内神经外科清空和四个Port-A-Cath置换)。全部使用绕过疗法。未针对此研究收集手术期间的抑制剂效价。

[0465] 结论

[0466] 总体而言, 这些结果显示, 使用rFVIII Fc的ITI为可能的并且可在经历第一次ITI的许多(高ITI失败风险)患者和经历援救性ITI的一些患者中引起抑制剂根除和成功ITI。此外, rFVIII Fc ITI显示在接受第一次ITI的大部分患者(不管其风险情况如何)中贝塞斯达效价的快速减小和快速的耐受作用时间。对于援救性ITI, 更难以得出结论, 因为这些患者中大部分患者在数据收集时仍经历使用rFVIII Fc的ITI。然而, 接收援救性治疗的一些患者似乎获得治疗益处, 因为其实现贝塞斯达阴性或显示抑制剂效价显著降低。特别是当每

日施用较高rFVIIIFc给药($\geq 130\text{IU/kg}$)时。

[0467] 实施例5

[0468] 在A型血友病中使用因子的替代疗法的主要并发症为在约30%患有重度A型血友病的患者中形成抑制剂(其中和抗因子VIII抗体)。抑制剂产生影响治疗功效以及受影响个体的生活质量。血友病研究正努力进一步理解免疫系统如何响应于重组因子III(rFVIII)以有效根除抑制剂。延长半衰期rFVIII Fc融合蛋白(rFVIIIFc)为预防并控制出血事件的有效且良好耐受的疗法。此分子中的Fc区不仅负责增加rFVIII半衰期,还可促进抗原特异性耐受性,如临床前动物模型中所示(Krishnamoorthy S,等,Cell Immunol.301:30-39(2016))和如免疫耐受性诱导病例报道所表明(Groomes CL,等,Pediatr Blood Cancer 63(5):922-24(2016);Malec LM,等,Haemophilia 22(6):e552-e554(2016);Ragni MV,等,Haemophilia 22(5):e462-e464(2016))。

[0469] 方法

[0470] 外周血来源的人类APC或THP-1单核细胞用于研究rFVIIIFc对Fc γ R结合、内化、信号传导和细胞因子产生的影响、以及基因表达变化、以及随后体外在T细胞上的相互作用和影响(图1)。

[0471] 结果

[0472] Fc γ R的细胞表面表达减小指示在rFVIIIFc处理时发生内化(图2A-2C)。将单核细胞来源的巨噬细胞和树突细胞用等摩尔浓度(200nM)的辣根过氧化物酶免疫复合物(HRP-IC)(作为阳性对照)、人类免疫球蛋白G1(IgG1)(作为阴性对照)和重组因子VIII(rFVIII)或rFVIII Fc融合蛋白(rFVIIIFc)处理24小时。Fc γ 受体(Fc γ R)CD16(图2A)、CD32(图2B)和CD64(图2C)的细胞表面表达通过流式细胞术测量($n=3$;** $P\leq 0.01$,*** $P\leq 0.005$,其他处理的HRP-IC的显著性未示出)。与用rFVIII处理之后的表面表达相比,用rFVIIIFc处理与CD16(图2A)、CD32(图2B)和CD64(图2C)的细胞表面表达减小相关。

[0473] rFVIIIFc接合Fc γ R并且诱导单核细胞和巨噬细胞的信号传导,而随后无促炎性细胞因子产生(图3A-3C)。将THP-1单核细胞系、单核细胞、外周血单核细胞来源的巨噬细胞和外周血单核细胞来源的树突细胞用HRP-IC、IgG1、rFVIII或rFVIIIFc处理15分钟(图3A)。使用MSD平台测量细胞溶解产物中的Syk磷酸化($n=3-7$,* $P\leq 0.05$)。在用rFVIIIFc(WT)、用突变rFVIIIFc(其不能结合至新生Fc受体(FcRn突变体))或用突变rFVIIIFc(其不能结合至Fc γ R(Fc γ R突变体))处理巨噬细胞之后测量Syk磷酸化($n=4$,* $P\leq 0.05$) (图3B)。通过MSD ELISA测量二十四小时处理的巨噬细胞的促炎性细胞因子产生($n=4$,显著性未示出)(图3C)。

[0474] rFVIIIFc磷酸化分子部分参与免疫调控的分子,而非在活化和促炎性细胞因子产生中起作用的分子(表3和图4)。使用Proteome Profiler磷酸激酶和磷酸免疫受体阵列研究用rFVIIIFc处理十五分钟的单核细胞来源的巨噬细胞的溶解产物中的磷酸化蛋白。通过Proteome Profiler分析识别的rFVIIIFc处理的巨噬细胞中磷酸化分子的列表显示于表3中。使用MSD平台测量负责抑制信号传导的磷酸酶的磷酸化($n=3$;** $P\leq 0.01$,*** $P\leq 0.005$) (图4)。

[0475] 表3:通过Proteome Profiler分析识别的rFVIIIFc处理的巨噬细胞中磷酸化分子。

磷酸化蛋白							
[0476]	免疫受体	ILT6/CD85c	NKp46/NCR1	FcH5/IRTA2	激酶	SRC	STAT5
		KIR2DL4	Siglec9	Siglec2/CD22		CREB	cJun
		SLAMF8	SLAMF4	CDCIR/CLEC4 α		pRAS40	p53
		Fc γ RIIIA/B	Fc γ RIIA	DECTIN-1/CLEC7 α		ERK1/2	WNK1
		PECAM/CD31	FcRH4/IRTA1	KNKp44/NCR2		HSP27	p70S6
		CLEC-2	SHP2	Siglec7		JNK1/2/3	FAK
		TREM2	ILT2/CD85j	SLAMF5		AMPK α 2	GSK-3 α/β
		SHP1	ILT3/CD85k	Siglec3/CD33		STAT2	RSK1/2/3
		TREML1/TLT-1	ILT4/CD85d	Siglec5		STAT6	p53

[0477] rFVIIIIFc诱导致耐受性巨噬细胞的基因表达模式特征(图5A-5G)。对用IgG1、rFVIII或rFVIIIIFc处理六小时的单核细胞来源的巨噬细胞(n=3)执行显著下调的基因(图5A)和显著上调的基因(图5B)的探索性RNA测序,并且对rFVIIIIFc上调的基因进行途径分析以研究这些细胞中选择性表示的分子途径,与rFVIII处理的细胞进行比较(表4)。发现NRF2和PPAR- γ 途径的各种基因以及各种其他免疫调控剂已上调(图5H)。通过Q-PCR验证NRF2和脂质代谢途径的选择基因(n=8;*P \leq 0.05,**P \leq 0.01,***P \leq 0.005)(图5C-5G)。此外,发现rFVIIIIFc处理的巨噬细胞展现出特征性M2样表型(图5I-5M)。具体而言,用rFVIIIIFc处理的巨噬细胞在6小时(图5I)之后和24小时(图5J)之后具有比用rFVIII处理的细胞高的相对CD206表达,并且用rFVIIIIFc处理的巨噬细胞在24小时之后具有比用rFVIII处理的细胞高的相对ARG1表达(图5M)。

[0478] 表4:对rFVIIIIFc上调的基因进行途径分析以研究这些细胞中选择性表示的分子途径,与rFVIII处理的细胞进行比较。

[0479]

途径名称	组大小	包含的候选者	P值	q值
NRF2途径	142	10(7.0%)	4.07e-06	0.000273
脂蛋白代谢	68	7(10.3%)	1.01e-05	0.000338
脂质消化、移动和转运	110	8(7.3%)	3.06e-05	0.000684
半胱氨酸和甲硫氨酸代谢-智人(人类)	45	5(11.1%)	0.000137	0.00229
C-MYB转录因子网络	86	6(7.0%)	0.000389	0.00521
核受体代谢途径	316	11(3.5%)	0.000813	0.00908

[0480] rFVIIIIFc处理的抗原呈递细胞影响需要APC-T细胞-细胞接触的调控T细胞分化(图6A-6C)。将外周血单核细胞来源的巨噬细胞用IgG1、rFVIII或rFVIIIIFc处理,然后与从相同供体的外周血分离的原初(naïve)CD4阳性T细胞进行共培养。在共培养六日之后(图6A),使用流式细胞术定量调控性T细胞(CD4+CD25+FoxP3+)的百分比(n=4)(图6B)。当将原初T细胞于用IgG1、rFVIII或rFVIIIIFc预处理的APC的条件培养基中培养时也定量调控性T细胞的百分比(n=4)(图6C)。

[0481] 结论

[0482] rFVIIIIFc似乎通过APC上的Fc γ 受体结合并诱导内化和信号传导。此信号传导不翻译成促炎性细胞因子产生并且不活化APC(数据未示出)。免疫调节信号传导事件在rFVIIIIFc处理时开始。这些事件似乎驱使巨噬细胞朝向M2样表型分化,所述表型的特征在

于NRF2和PPAR γ 途径(图5H)的上调以及CD206和精氨酸酶1分子的上调。各种其他免疫调控剂也显示表达增加,同时至少鸟苷酸环化酶1可溶性亚基 β (2GUCY1B2)、原卟啉原氧化酶(PPOX)和细胞因子信号传导抑制剂3(SOCS3)显示rFVIIIIFc处理的细胞中的表达减小(图5H)。这些巨噬细胞可执行先前报导的有益的免疫学效应,诸如调控性T细胞分化、FVIII耐受作用和抗FVIII抑制剂减少(图7)。

[0483] 实施例6

[0484] 早期临床前和临床数据指示,rFVIIIIFc当用于ITI治疗时可允许相对短的阴性抑制剂效价时间,这可能归因于由所述分子的Fc结构域所致的免疫调节效应。为了获得更稳健的临床数据,发展标准化方案。此处呈现研究设计。

[0485] ReITIRate (NCT03103542) (前瞻性、介入性、多中心、开放式) 研究目的在于招募20名先前ITI尝试失败的所有年龄段的重度HA抑制剂患者。研究的主要目的为描述60周的时间范围内用rFVIIIIFc执行的ITI的结果。主要终点为ITI成功;并且在ITI治疗期间评定的次要终点将包括ITI成功的时间、复发发生、出血数、rFVIIIIFc消耗、缺课或缺班的天数、住院和依从性。ITI治疗将包括rFVIIIIFc 200IU/kg/日(每日一次或分成两个每日剂量)持续最多60周。在实现耐受性之后,随后以预防性给予的rFVIIIIFc的16周和32周追踪的减量期。成功标准将包括阴性抑制剂效价(<0.6 个贝塞斯达单位)、预期 $>66\%$ 的增量恢复率和 ≥ 7 小时的终末半衰期。

[0486] 图8示出提出的rFIXFc对巨噬细胞的作用。rFVIIIIFc似乎通过APC上的Fc γ 受体结合并诱导内化和信号传导。此信号传导不翻译成促炎性细胞因子产生并且不活化APC。相反,免疫调节信号传导事件在rFVIIIIFc处理时起始。这些事件似乎驱使巨噬细胞朝向‘Mox/M2样’表型分化,所述表型的特征在于NRF2和PPAR γ 途径的上调。

[0487] 具体实施方案的前文描述将充分地揭示本发明的一般性质,以使得其他人通过应用本领域中的知识,在无不当实验并且不背离本发明的一般范围的情况下,可容易地针对各种应用对这些具体实施方案进行修改和/或改变。因此,基于本文呈现的教导和指导,这些改变和修改意图处于所公开实施方案的等效物的含义和范围内。应了解,本文的措辞或术语是出于描述而非限制的目的,以使得本说明书的术语或措辞应由本领域技术人员根据教导和指导进行解释。

[0488] 从本文所公开的本发明的说明书和实践考虑,本发明的其他实施方案对本领域技术人员而言将为显而易见的。意图将说明书和实施例视为仅示例性,并且本发明的真实范围和精神通过以下权利要求书指示。

[0489] 本文中公开的所有出版物、专利和专利申请均以引用的方式并入本文中,其引用程度就如同具体且个别地指示每个个别出版物、专利或专利申请以引用的方式并入本文中一般。

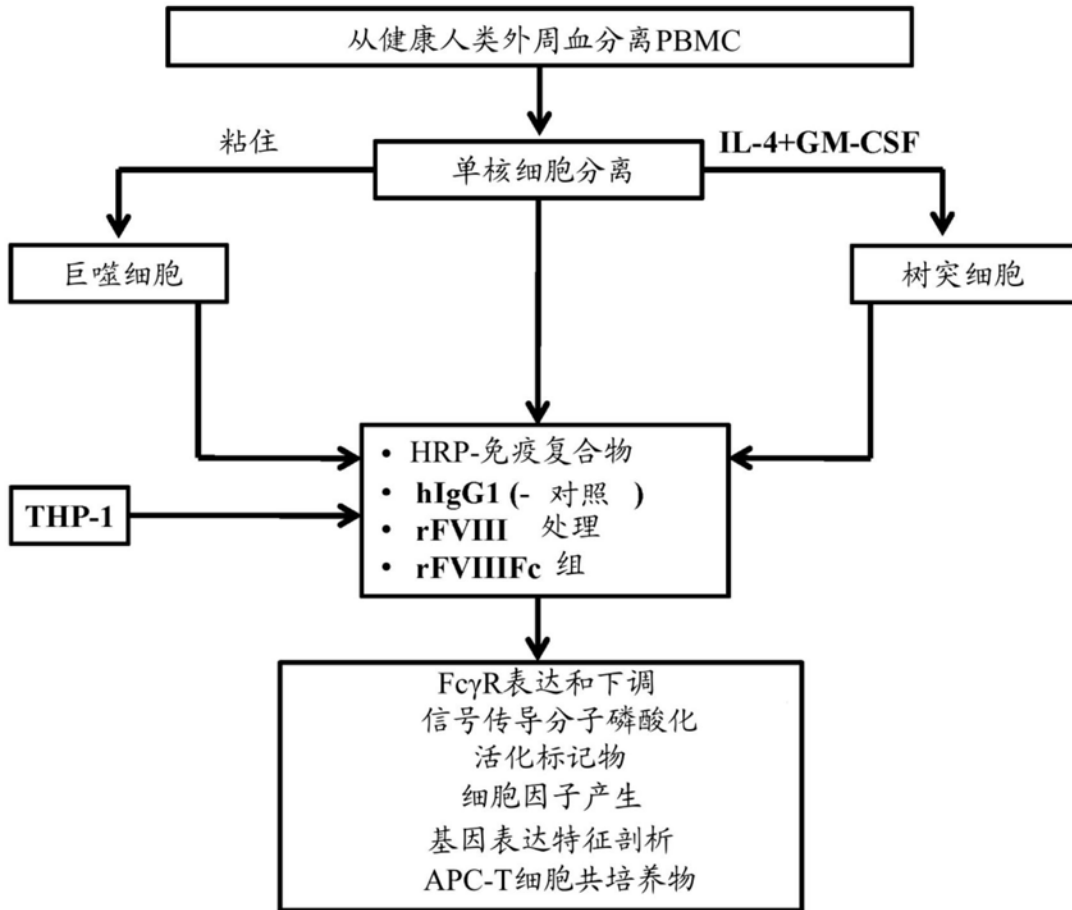


图1

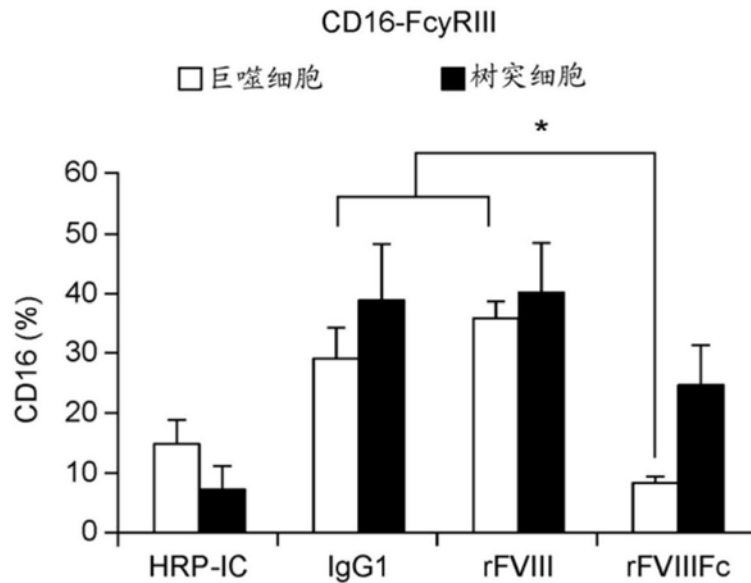


图2A

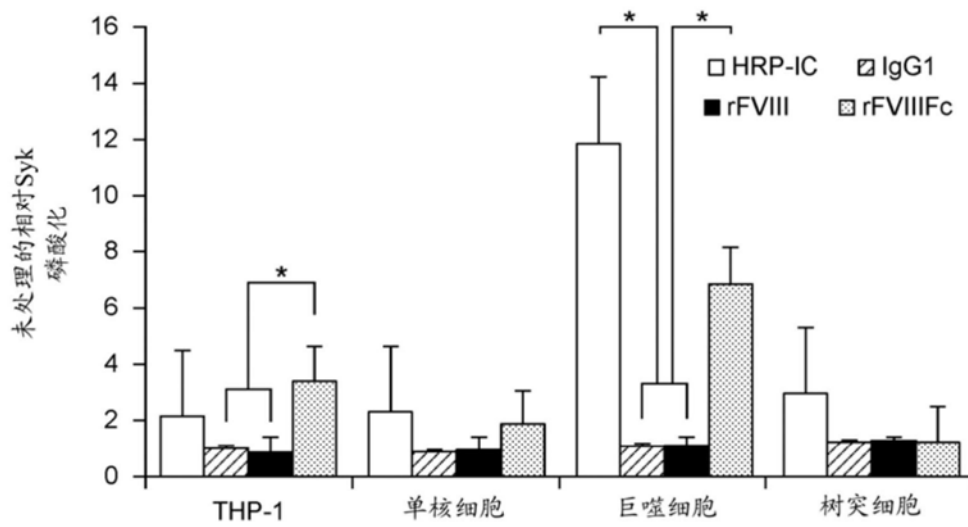
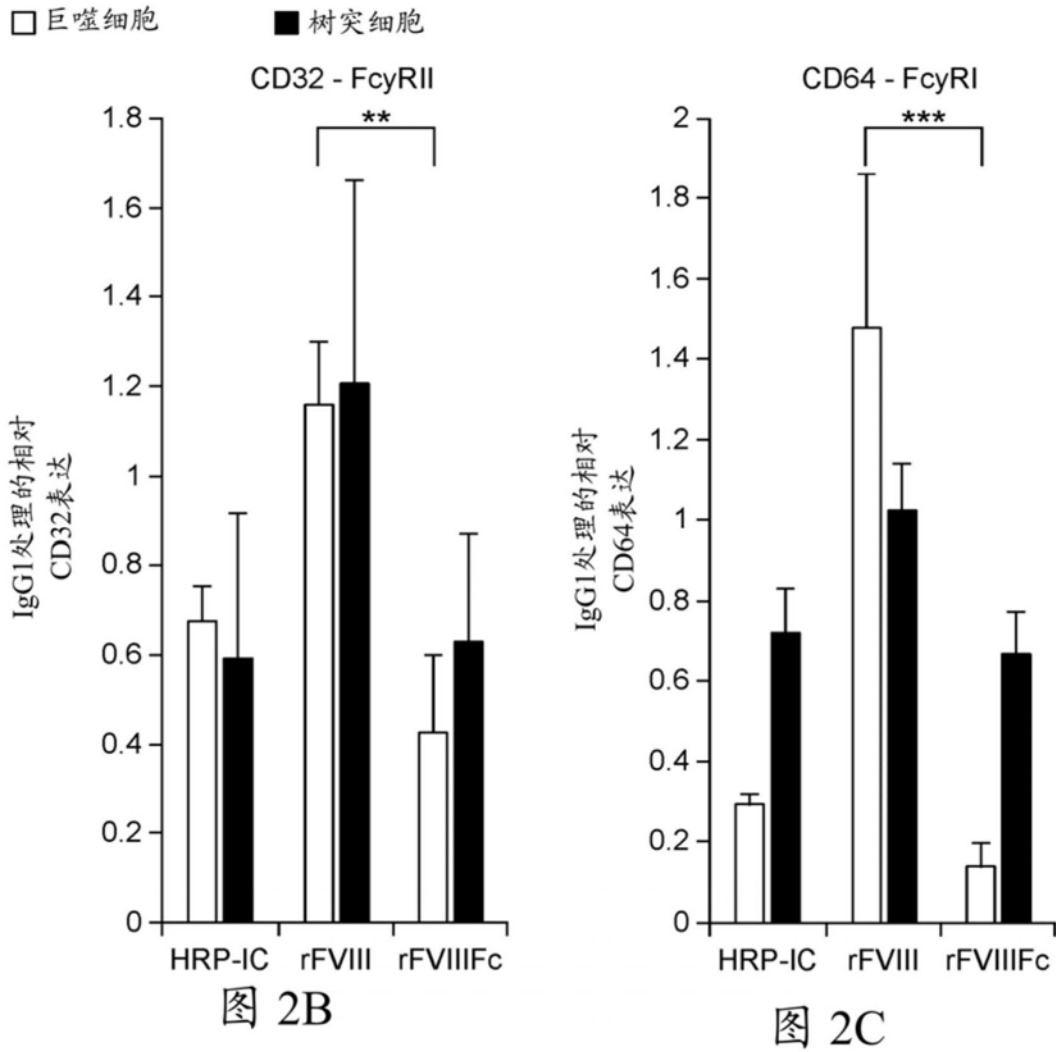


图3A

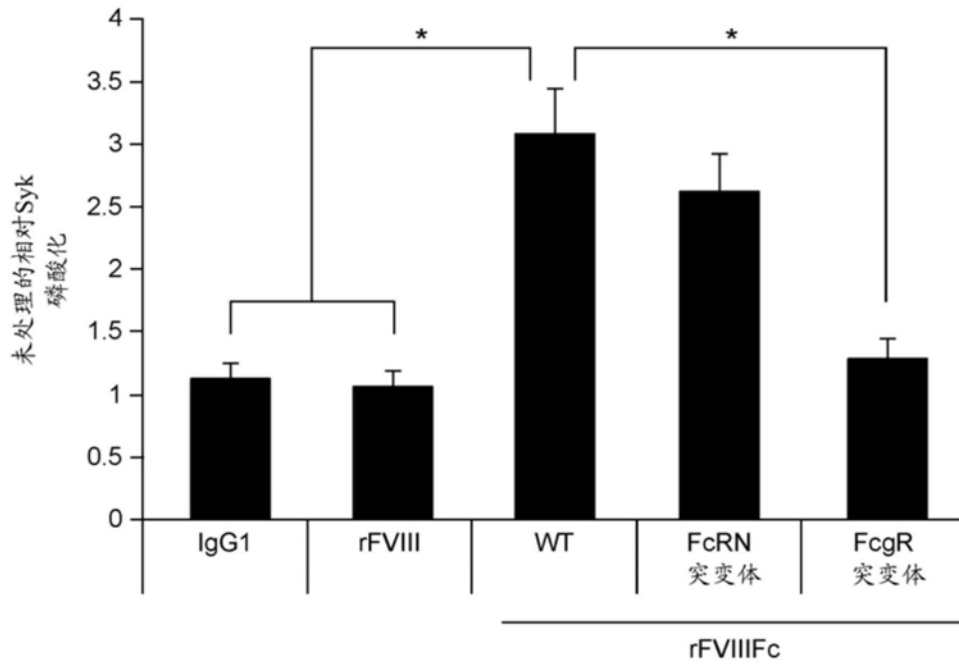


图3B

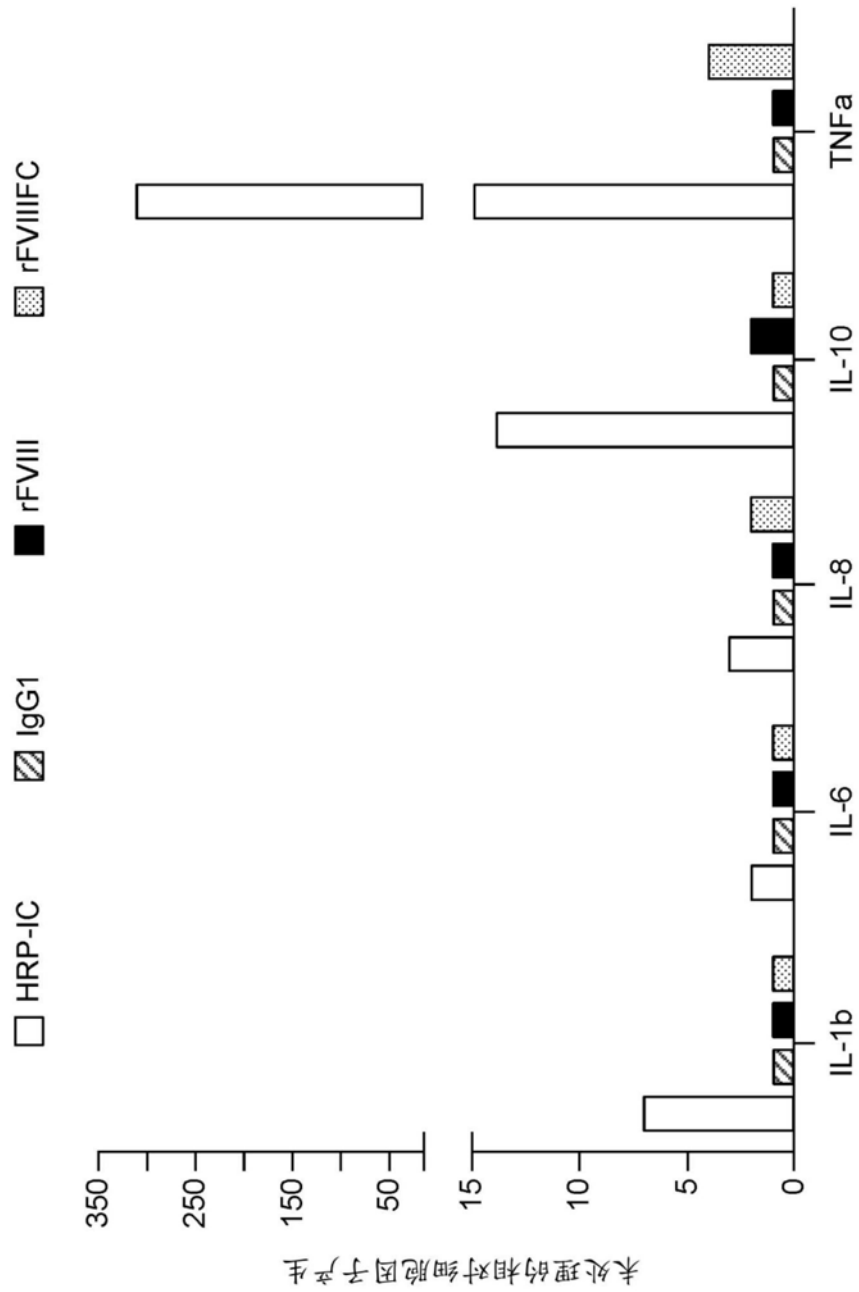


图3C

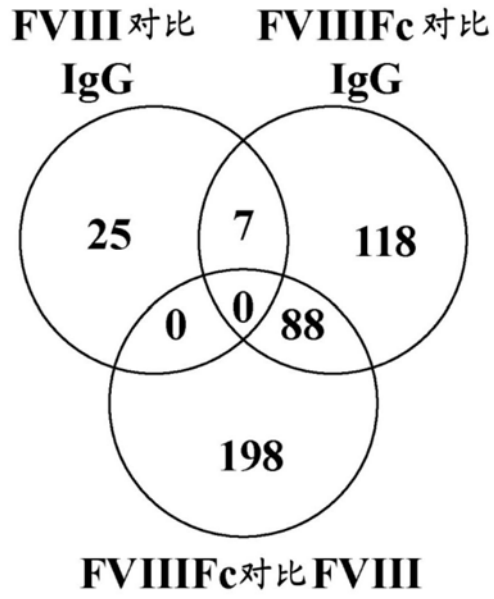


图5A

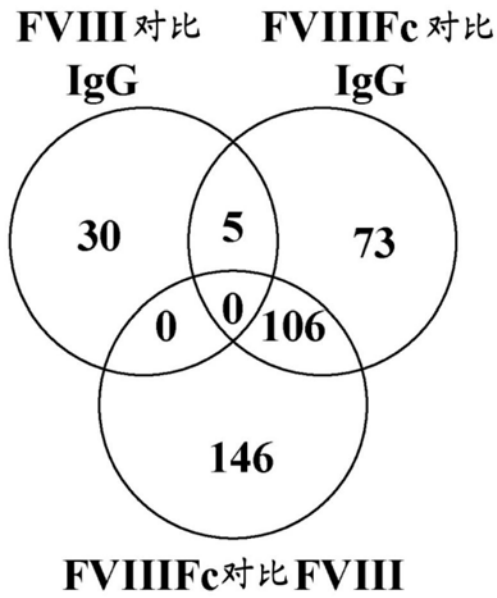


图5B

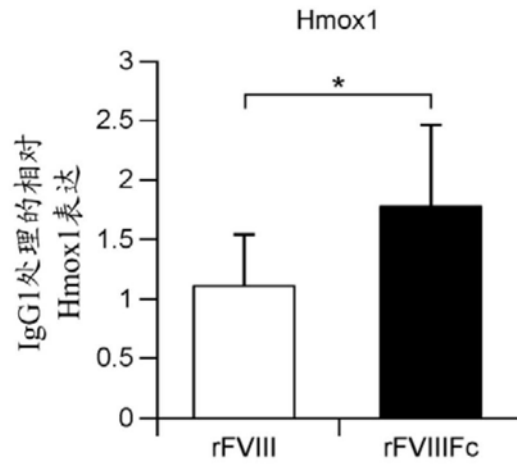


图5C

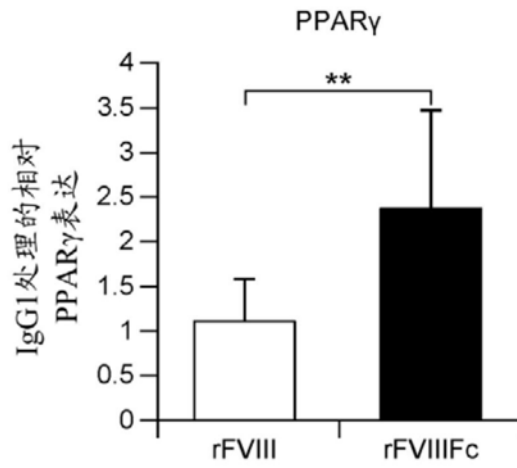


图5D

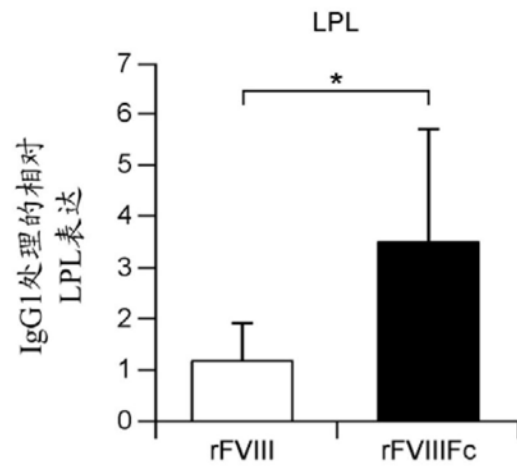


图5E

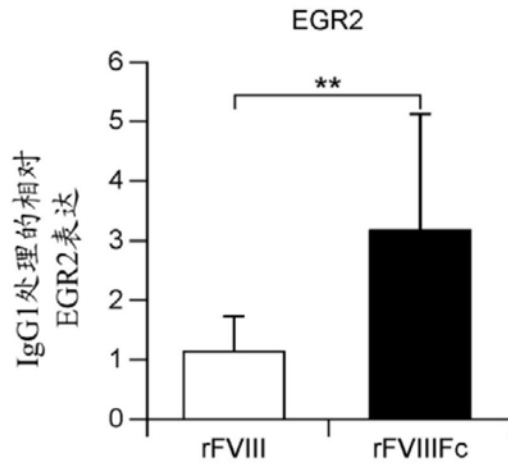


图5F

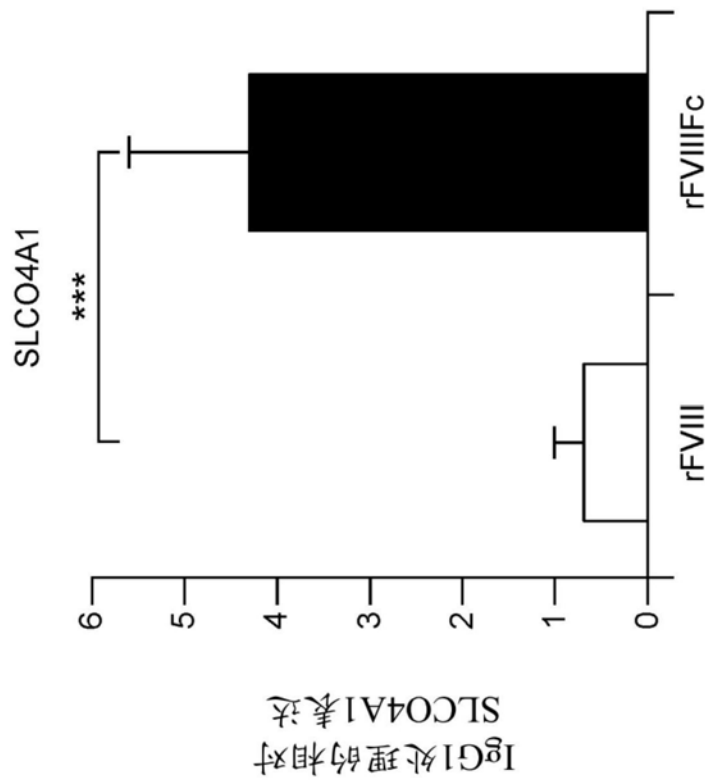


图5G

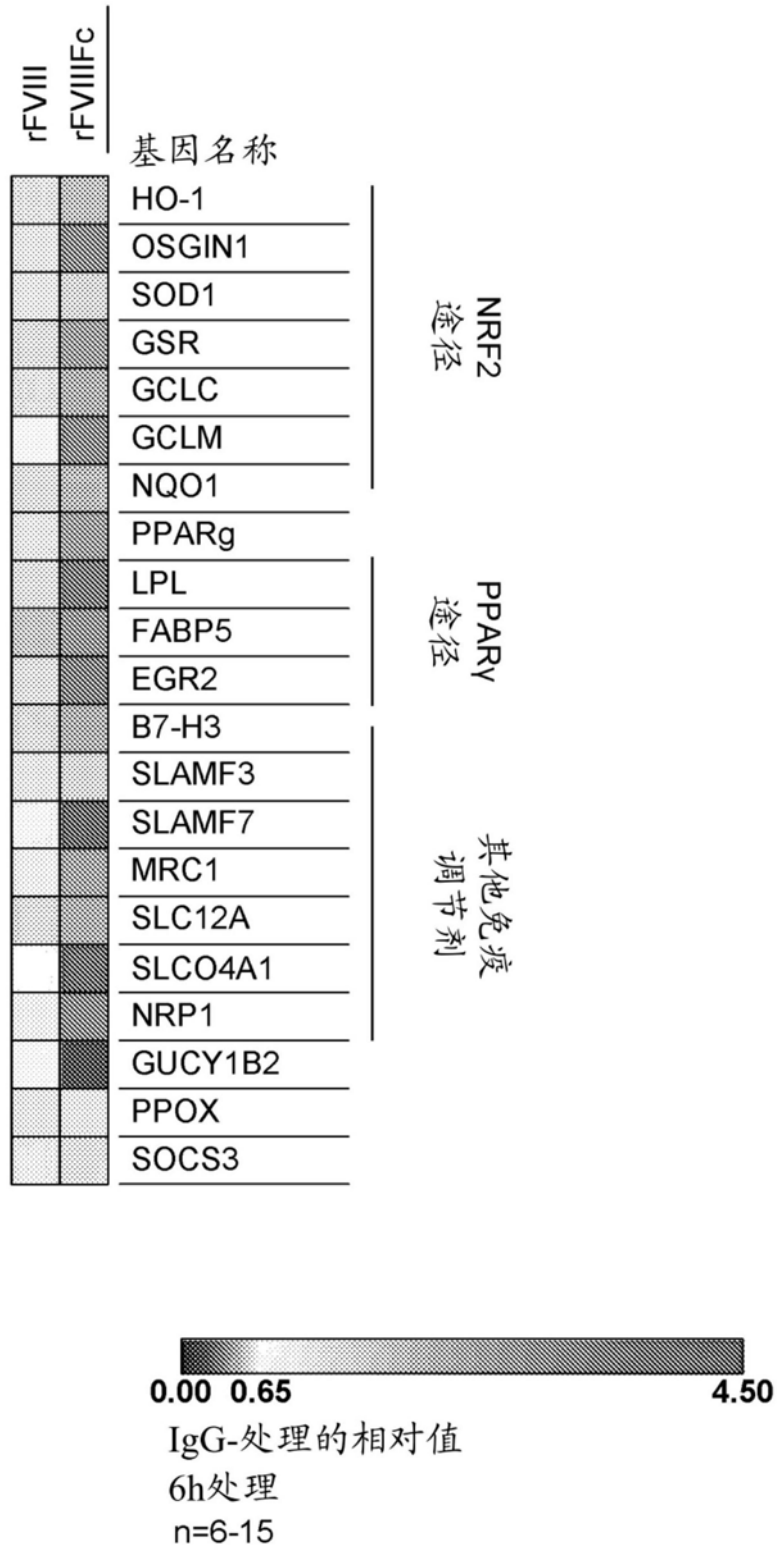


图5H

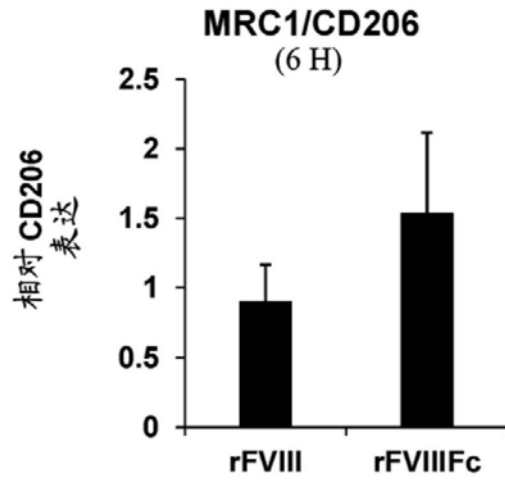


图5I

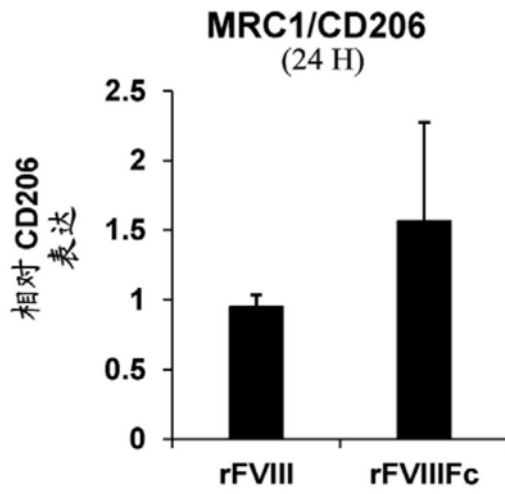


图5J

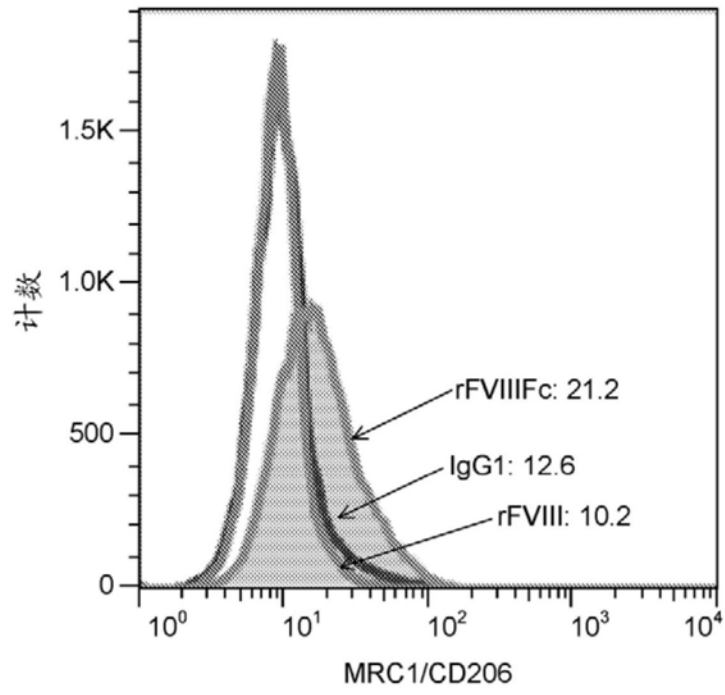


图5K

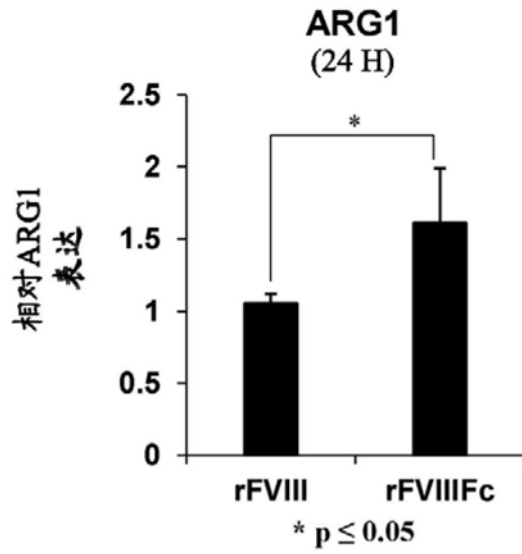


图5L

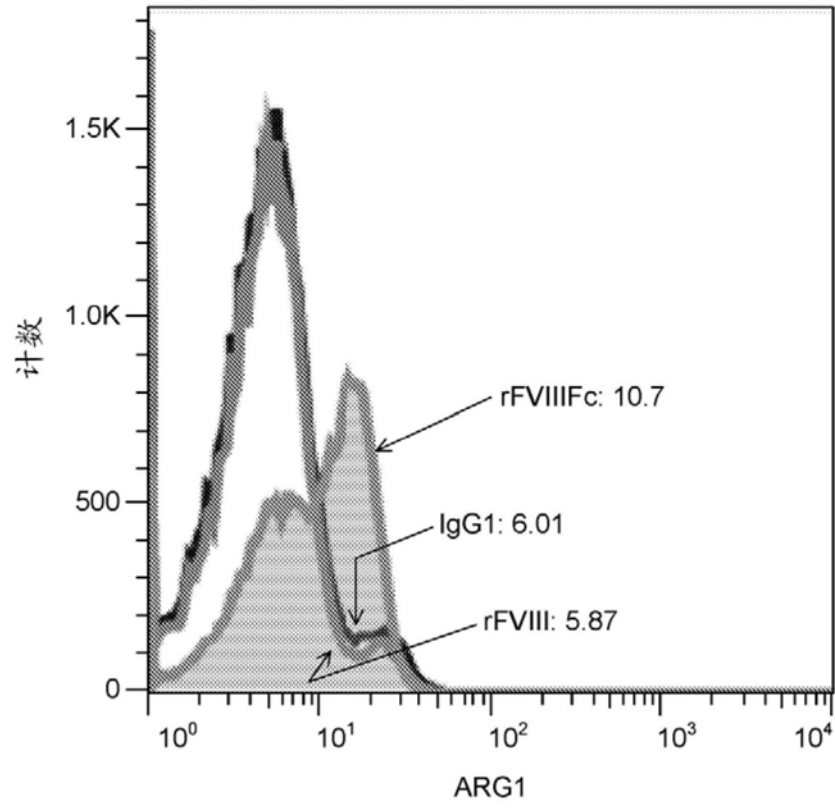


图5M

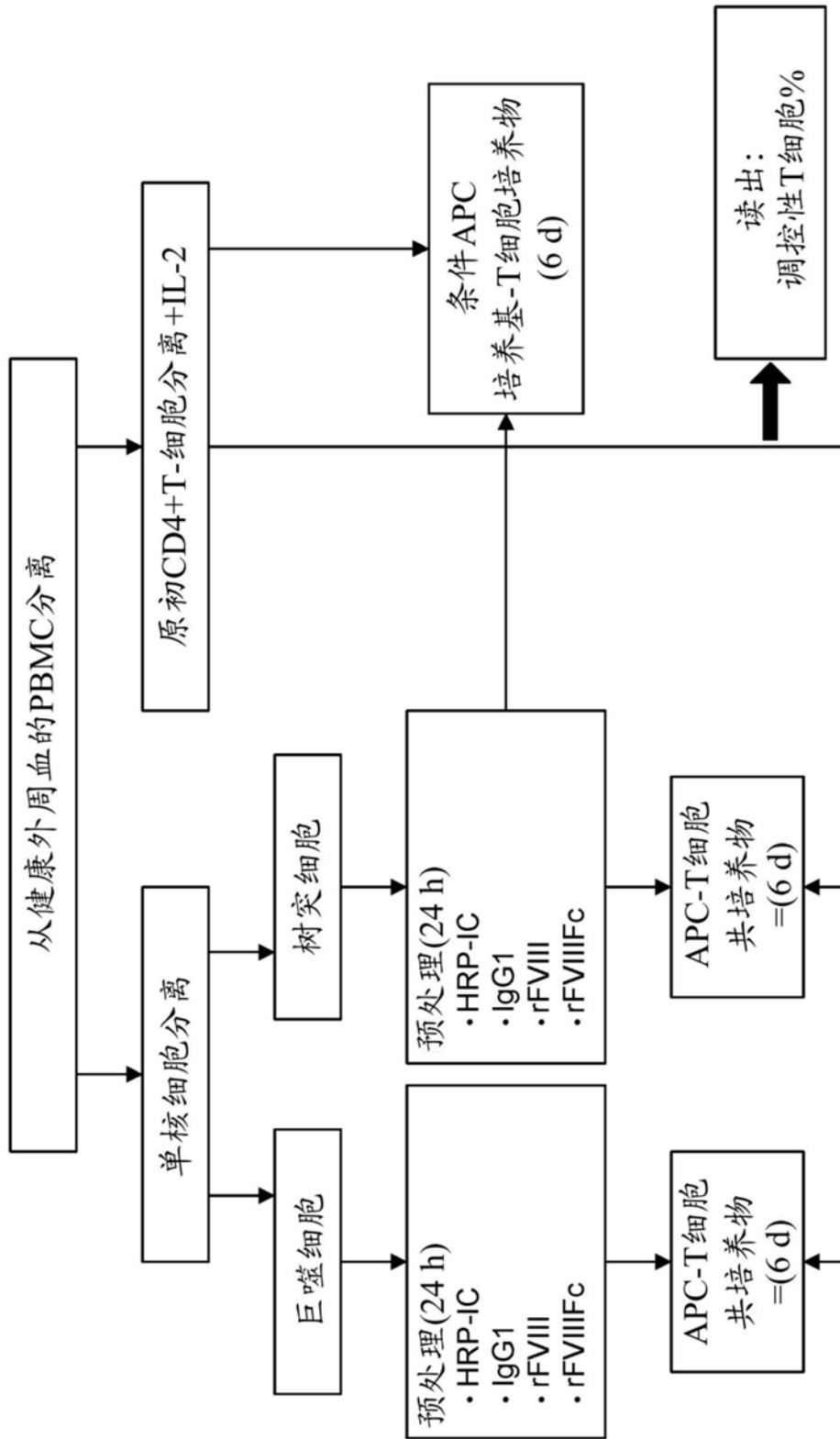


图6A

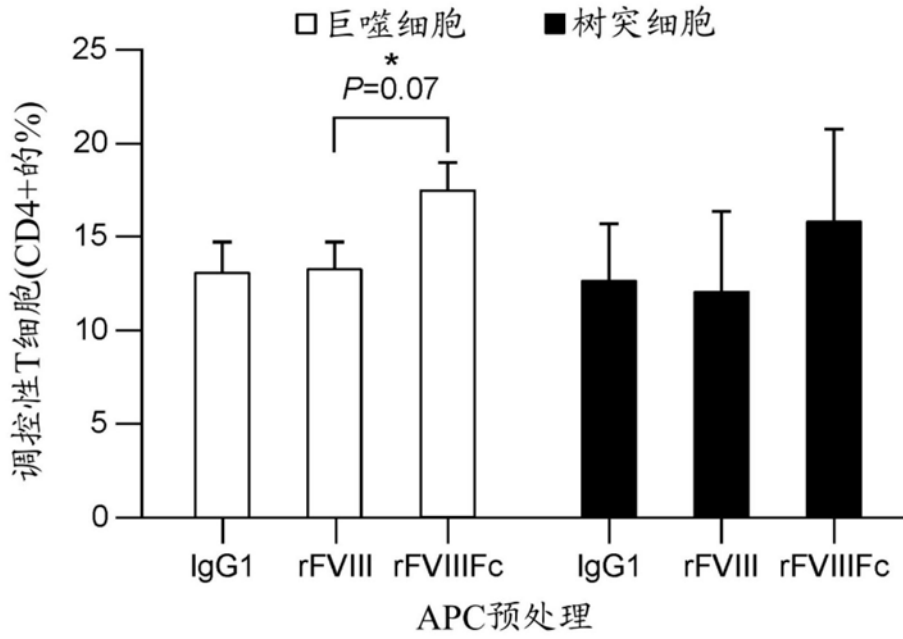


图6B

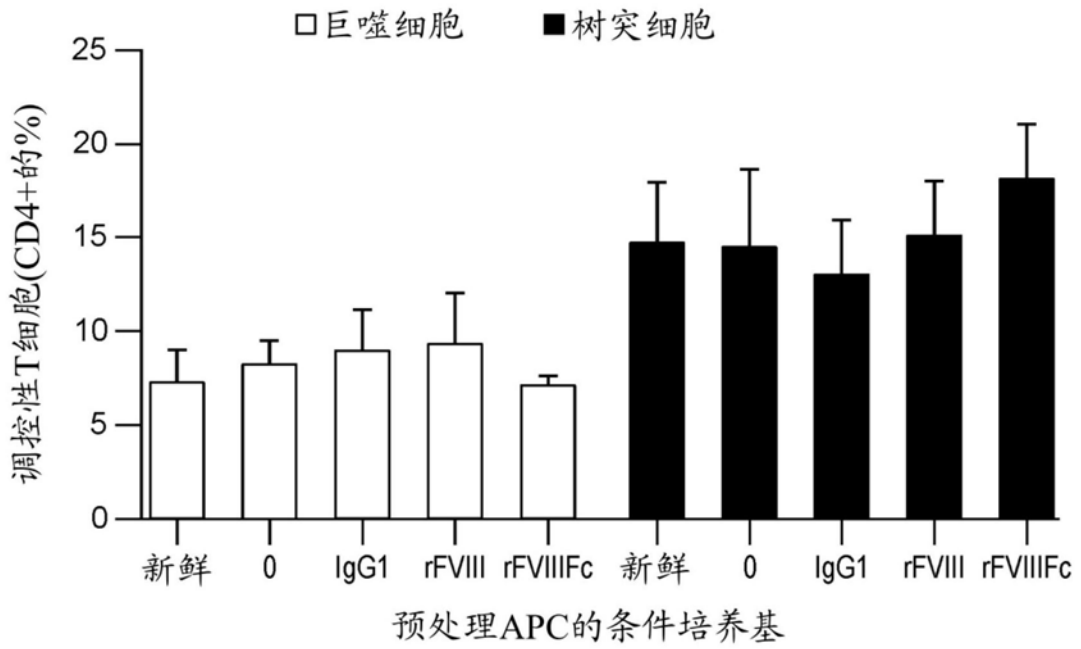


图6C

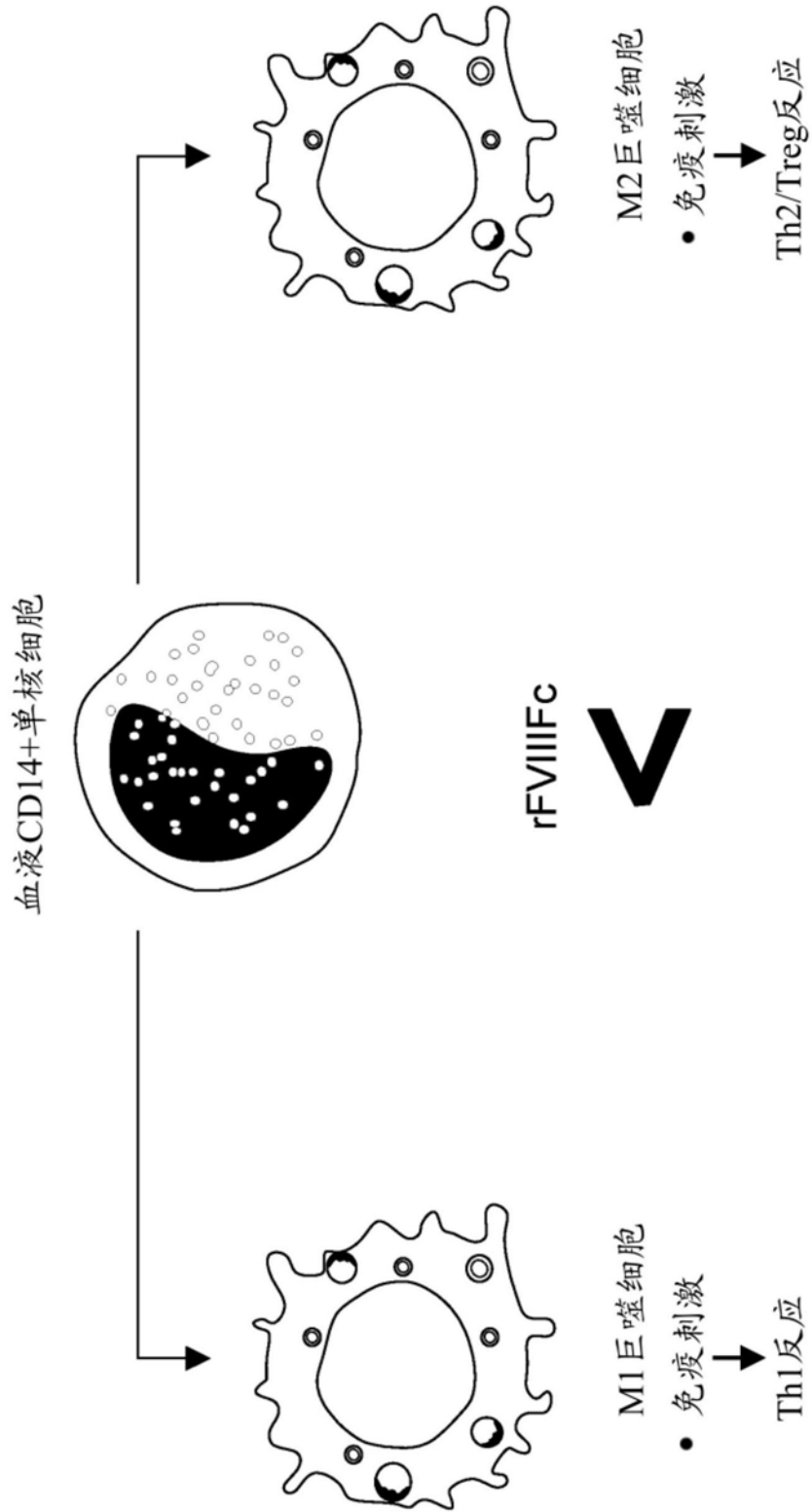


图7

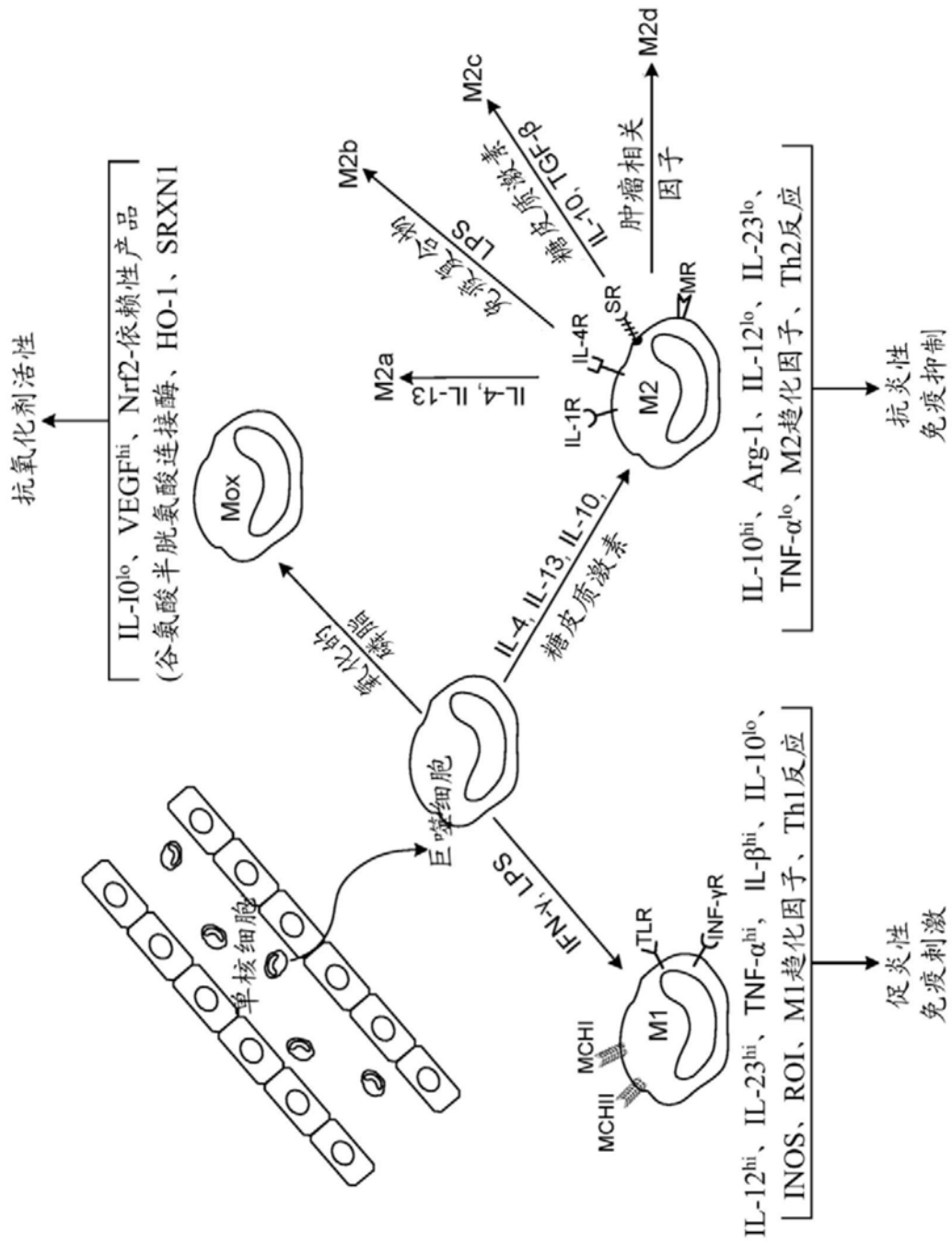


图8